

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 326**

51 Int. Cl.:

A61P 17/06	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)
A61K 31/225	(2006.01)
A61K 31/25	(2006.01)
C07C 69/60	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2015 PCT/EP2015/058257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2015 E 15719988 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3131633**

54 Título: **Derivados de MMF de etilenglicoles**

30 Prioridad:

17.04.2014 EP 14165226
26.06.2014 EP 14174055

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2020

73 Titular/es:

ALBRECHT, WOLFGANG (100.0%)
Alfred-Mendler-Weg 15/1
89075 Ulm, DE

72 Inventor/es:

ALBRECHT, WOLFGANG;
SELIG, ROLAND;
LEHMANN, FRANK;
GUSERLE, RICHARD y
MAIER, ANNEMARIE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 795 326 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de MMF de etilenglicoles

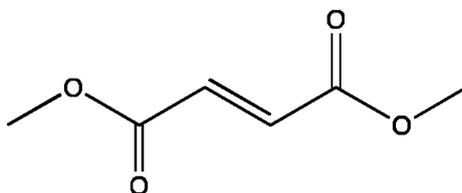
5 La presente invención se refiere a compuestos novedosos, por ejemplo, para su uso como medicamento. En particular, la presente invención se refiere a profármacos novedosos de fumarato de monometilo (MMF) adecuados como medicamento, preferentemente en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias y/o enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple y psoriasis. Adicionalmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los compuestos novedosos.

10

Antecedentes de la invención

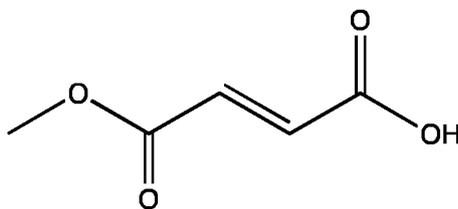
El fumarato de dimetilo (DMF) es un agente terapéutico oral que se ha publicado que reduce el rechazo que con frecuencia se produce con respecto a un trasplante de órganos (reacción de hospedador frente a injerto). Adicionalmente, el DMF está aprobado por ser adecuado como medicamento para el tratamiento o la prevención de una diversidad de enfermedades. Por ejemplo, se propone el DMF en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la esclerosis múltiple. Adicionalmente, se sugiere que el DMF es un agente farmacéutico activo adecuado en el tratamiento de la psoriasis. El DMF se caracteriza por la siguiente Fórmula química (1):

20



Fórmula (1)

25 Cuando se toma por vía oral, se ha publicado que el DMF es hidrolizado, por ejemplo, por esterasas en el intestino a fumarato de monometilo (MMF). El MMF puede considerarse como un metabolito del DMF y puede caracterizarse por la siguiente Fórmula química (2):



30

Fórmula (2)

Se ha publicado que los mecanismos de acción del DMF, o su metabolito MMF, incluyen la inhibición de la translocación nuclear inducida por citocinas del factor nuclear kappa B (NF-κB), la apoptosis de los linfocitos T estimulados y el aumento de la producción de las citocinas de T_H2 IL-4 e IL-5 en linfocitos T estimulados, mientras que la generación de la citocina de T_H1 interferón gamma (IFN-γ) se supone que permanece inalterada. Se describe que el DMF activa el factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), que se une a elementos de respuesta antioxidante en los promotores de genes protectores tales como NADPH-quinona-oxidoreductasa-1 (NQO1) y hemo-oxigenasa-1. Por lo tanto, esto en última instancia eleva los niveles del importante antioxidante intracelular glutatión (consúltese Albrecht P. et al., *Journal of Neuroinflammation* 2012, 9: 163).

Adicionalmente, se afirma que el tratamiento de animales o cultivos primarios de células del SNC con DMF o MMF dio como resultado un aumento de los niveles nucleares de Nrf2 activo, con la posterior regulación positiva de los genes diana antioxidantes canónicos. El tratamiento con DMF o MMF aumentó el potencial redox celular, el glutatión, los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial de manera dependiente de la concentración. El tratamiento de astrocitos o neuronas con DMF o MMF también mejoró significativamente la viabilidad celular después de la exposición a un oxidante tóxico de manera dependiente de la concentración. Este efecto sobre la viabilidad se perdió en las células que tenían Nrf2 eliminado o reducido. Estos datos sugieren que DMF y MMF son citoprotectores para las neuronas y los astrocitos contra la lesión y la pérdida celular inducidas por estrés oxidativo, potencialmente a través de la regulación positiva de una respuesta antioxidante dependiente de Nrf2. Por lo tanto, en resumen, se indica que *in vivo* DMF y MMF muestran aproximadamente la misma eficacia, en particular sobre el factor de transcripción Nrf2.

45

50

Como se ha mencionado anteriormente, cuando se toma por vía oral, el DMF es hidrolizado bastante rápido por las esterasas en el intestino a fumarato de monometilo (MMF). Por lo tanto, se liberan cantidades significativas de MMF en un período de tiempo corto. En principio, se esperaba que una hidrólisis tan rápida proporcionase un nivel alto de MMF en el plasma en un período de tiempo corto. Sin embargo, se ha descubierto que podría no conseguirse un nivel plasmático alto de MMF. Una razón podría ser que el organismo podría no ser capaz de transferir la cantidad completa de MMF a los sitios del cuerpo donde tiene lugar la acción farmacológica.

El documento US 2010/048651 A1 (Gangakhedkar Archana [EE.UU.] et al.) se refiere a profármacos de hidrógeno fumarato de metilo, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos profármacos y a métodos de uso de dichos profármacos y composiciones farmacéuticas de los mismos para tratar enfermedades tales como psoriasis, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis.

Adicionalmente, se ha publicado que el DMF debe administrarse en cantidades bastante altas y que el agente farmacéuticamente activo con frecuencia muestra efectos secundarios no deseables, tales como enrojecimiento y especialmente síntomas relacionados con el aparato gastrointestinal, tales como irritación del estómago y diarrea.

Por consiguiente, todavía existe la necesidad de nuevos medicamentos, preferentemente para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y psoriasis. Los medicamentos deben ser susceptibles de aplicarse en dosis apropiadas y no deben provocar efectos secundarios no deseados significativos.

Por lo tanto, era un objeto de la presente invención superar los inconvenientes de la sustancia farmacológica comercial mencionada anteriormente, DMF.

Era un objeto desarrollar un compuesto para su uso como medicamento para las enfermedades mencionadas anteriormente en donde dicho compuesto muestra propiedades farmacocinéticas ventajosas.

En particular, deben proporcionarse compuestos que se hidrolicen de manera diferente a MMF, por ejemplo, más rápidamente o más lentamente, especialmente más lentamente que DMF en el cuerpo humano (o en condiciones respectivas *in vitro*).

Adicionalmente, los compuestos deberían provocar preferentemente pocos efectos secundarios no deseables.

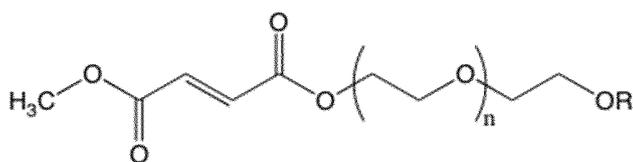
Adicionalmente, era un objeto de la presente invención proporcionar compuestos que puedan usarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, preferentemente la fase temprana de una enfermedad autoinmunitaria, en particular, de esclerosis múltiple, de manera que el progreso de la enfermedad pueda retrasarse.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, los objetivos anteriores se consiguen mediante los compuestos específicos que se describen en el presente documento por la Fórmula (I). Dichos compuestos pueden usarse como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y psoriasis.

Los compuestos de la invención pueden considerarse como profármacos de MMF. En general, un profármaco puede considerarse como una sustancia que se administra a un sujeto (preferentemente humano) en una forma farmacológicamente inactiva o farmacológicamente menos que completamente activa y, posteriormente, se convierte en el cuerpo del sujeto en un fármaco activo, preferentemente a través de procesos metabólicos que se producen en el cuerpo del sujeto. En otras palabras, un profármaco por lo general sirve como un tipo de "precursor" del fármaco previsto.

Por lo tanto, el sujeto de la presente invención es un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I)



Fórmula (I),

en donde R es hidrógeno y n es un número entero de 1 a 10, o R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es un número entero de 2 a 10; o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos.

Se descubrió que los compuestos de la presente invención muestran propiedades farmacéuticas y/o farmacocinéticas superiores. En particular, los compuestos muestran una velocidad de hidrolización ventajosa de manera que la dosis más baja del compuesto pueda aplicarse al paciente.

5 Otro sujeto de la invención es un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) en donde R es hidrógeno o trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es un número entero de 0 a 10; o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos para su uso como medicamento.

10 Adicionalmente, la presente invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) en donde R es hidrógeno o trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es un número entero de 0 a 10; o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos para su uso en el tratamiento de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide, preferentemente para el tratamiento de la esclerosis múltiple o la psoriasis, en particular, de la múltiples esclerosis.

15 Otro sujeto es una composición farmacéutica que comprende el compuesto mencionado anteriormente de acuerdo con la Fórmula (I).

Descripción detallada de la invención

20 En el contexto de la presente invención, el compuesto de la presente invención se representa por la Fórmula (I) anterior. Adicionalmente, el compuesto puede referirse a sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos, polimorfos y mezclas de los mismos. Por ejemplo, la invención también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de acuerdo con la Fórmula (I) o a solvatos de sales o hidratos o polimorfos o similares. 25 Lo mismo se aplica para todas las realizaciones, por ejemplo, para compuestos de Fórmulas (II), (III), (VI) y (VII) como se muestra a continuación.

La variable n es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 6, más preferentemente de 1 a 3.

30 Se prefiere particularmente que n sea 1.

En una realización alternativa particularmente preferida, n es 2.

35 En una realización alternativa particularmente preferida, n es 3.

En una realización preferida, n puede ser 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

R es hidrógeno o trans -CO-CH=CH-COOCH₃.

40 En ambas alternativas, n puede definirse como anteriormente.

Preferentemente R puede ser hidrógeno. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), con R siendo hidrógeno, puede considerarse como un (oligo)etilenglicol en donde uno de los grupos hidroxilo está esterificado con MMF.

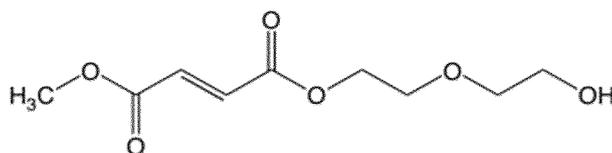
45 En una realización preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), n es 1 y R es hidrógeno.

50 En una realización alternativa preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), n es 2 y R es hidrógeno.

En otra realización alternativa preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), n es 3 y R es hidrógeno.

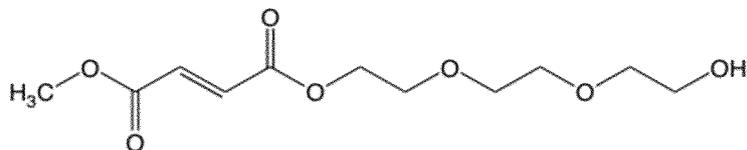
En una realización preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), R es hidrógeno y n es 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

55 Por lo tanto, en una realización especialmente preferida, el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (II), (III) y (IV)



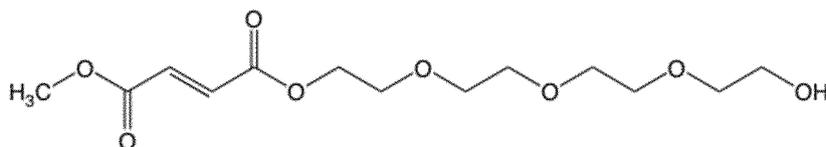
Fórmula (II),

60



Fórmula (III)

5



Fórmula (IV)

10 Como alternativa, preferentemente, R puede ser trans -CO-CH=CH-COOCH₃. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), con R siendo trans -CO-CH=CH-COOCH₃, puede considerarse como un (oligo)etilenglicol en el que ambos grupos hidroxilo están esterificados con MMF.

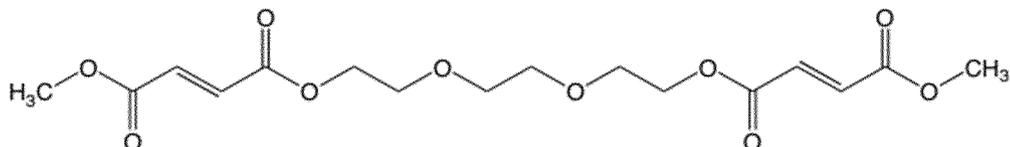
15 En una realización preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En una realización particularmente preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), n es 2 y R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃.

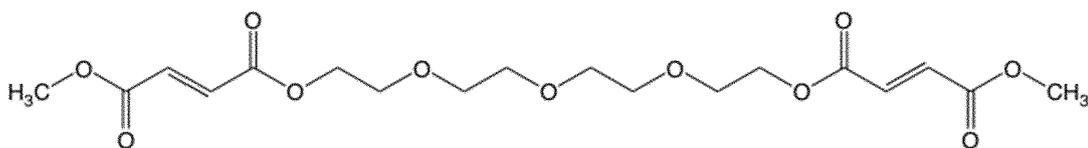
20 En una realización alternativa particularmente preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), n es 3 y R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃.

Por lo tanto, en una realización alternativa especialmente preferida, el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (VI) y (VII)

25



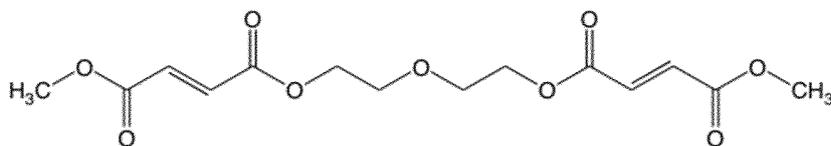
Fórmula (VI)



30

Fórmula (VII)

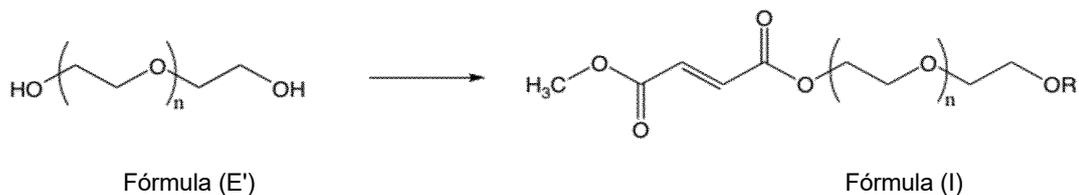
35 Se prefiere que, en particular para su uso no médico, un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) no se represente por un compuesto de acuerdo con la Fórmula (V)



Fórmula (V)

40

Un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) puede sintetizarse preferentemente a través de la siguiente vía:



5 Preferentemente, en la etapa un compuesto de acuerdo con la Fórmula (E') y MMF pueden someterse a una esterificación en un disolvente orgánico en presencia de un agente de acoplamiento. Un agente de acoplamiento es preferentemente una sustancia que generalmente facilita la formación de un éster o una amida. El agente de acoplamiento reacciona con un grupo carboxi formando un intermedio reactivo que posteriormente se hace reaccionar adicionalmente con un alcohol o una amina para formar el producto final, es decir, un éster o una amida. Pueden ser agentes de acoplamiento adecuados, por ejemplo, DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), EDC (clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida), CDI (carbonyldiimidazol), preferentemente EDC. Se prefiere adicionalmente que la reacción de acoplamiento se realice en presencia de un compuesto alcalino auxiliar. Son compuestos alcalinos adecuados, por ejemplo, piridina y aminas, tales como trietilamina, diisopropiletilamina y DMAP (4-(dimetilamino)piridina), en particular DMAP.

Un disolvente orgánico adecuado puede ser, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, dioxano, tetrahidrofurano y dimetilformamida.

20 Como alternativa, El MMF puede hacerse reaccionar preferentemente con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, preferentemente cloruro de oxalilo, para formar el cloruro de ácido correspondiente. Posteriormente, el cloruro de ácido correspondiente puede someterse a una reacción con el compuesto de acuerdo con la Fórmula (E'), preferentemente en un disolvente orgánico tal como dioxano, tetrahidrofurano, cloroformo o diclorometano. Adicionalmente, la reacción del cloruro de ácido con un compuesto de acuerdo con el compuesto de acuerdo con la Fórmula (E') se realiza preferentemente en presencia de un compuesto alcalino auxiliar. Son compuestos alcalinos adecuados, por ejemplo, piridina y aminas, tales como trietilamina, DMAP (4-(dimetilamino)piridina) y diisopropiletilamina, preferentemente trietilamina.

30 Como alternativa, el cloruro de ácido de MMF anterior puede transferirse adicionalmente en ésteres activados como el éster de paranitrofenol.

Además, de forma alternativa, el MMF puede hacerse reaccionar con cloruros de ácido, difenilfosforil azida o isocianato de clorosulfonilo para formar anhídridos (mixtos). Estos anhídridos mixtos también pueden someterse a reacciones adicionales para obtener formas adicionales de anhídridos. Por ejemplo, el anhídrido de fumarato de monometilo puede obtenerse mediante dicha preparación.

40 Posteriormente, un éster activado o anhídrido de MMF puede someterse a una reacción con el compuesto de acuerdo con la Fórmula (E'), preferentemente en un disolvente orgánico tal como dioxano, tetrahidrofurano, cloroformo, acetona o diclorometano. Adicionalmente, la reacción de un éster activado o anhídrido de MMF con el compuesto de acuerdo con la Fórmula (E') se realiza preferentemente en presencia de un compuesto alcalino auxiliar. Son compuestos alcalinos adecuados, por ejemplo, piridina y aminas, tales como trietilamina, diisopropiletilamina y DMAP (4-(dimetilamino)piridina), preferentemente DMAP.

45 Como alternativa, la reacción del éster activado o anhídrido de MMF con el compuesto de acuerdo con la Fórmula (E') puede realizarse preferentemente en ausencia de un compuesto alcalino auxiliar.

Un disolvente orgánico adecuado puede ser, por ejemplo, dioxano, tetrahidrofurano y dimetilformamida.

50 En una realización preferida, uno de los grupos hidroxilo del compuesto de acuerdo con la Fórmula (E') puede protegerse con un grupo de protección antes de someterse a una reacción con MMF en presencia de un agente de acoplamiento o con el cloruro de ácido de MMF o el anhídrido de MMF. Un grupo de protección de este tipo puede ser, por ejemplo, un grupo trialkilsililo.

55 Después de la reacción de acoplamiento, la protección puede retirarse preferentemente mediante una reacción adecuada.

60 Los compuestos anteriores de acuerdo con la Fórmula (I) muestran propiedades farmacocinéticas excelentes. En dos horas, los compuestos muestran una hidrólisis en MMF y residuo orgánico restante en donde la hidrólisis se modifica a la de DMF. Como resultado, se libera una cantidad menor de MMF en las dos horas y, por lo tanto, los compuestos pueden denominarse compuestos (profármacos de MMF) con una liberación intrínsecamente retardada de MMF. Adicionalmente, no se espera que el residuo orgánico restante dañe el organismo del paciente.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) en donde R es hidrógeno o trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es un número entero de 0 a 10 o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos para su uso como medicamento.

5 En una realización preferida, en un compuesto de Fórmula (I) para su uso como medicamento, n es un número entero de 0 a 10, preferentemente de 1 a 6 y más preferentemente de 1 a 3.

10 En una realización preferida, n es 0, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

Se prefiere particularmente que n sea 1.

En una realización alternativa particularmente preferida, n es 2.

15 En una realización alternativa particularmente preferida, n es 3.

En una realización preferida, en un compuesto de Fórmula (I) para su uso como medicamento, R es hidrógeno.

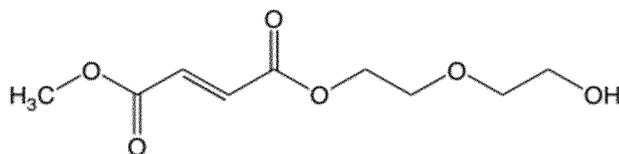
20 En una realización preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento, R es hidrógeno y n es 0, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En una realización particularmente preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento, n es 1 y R es hidrógeno.

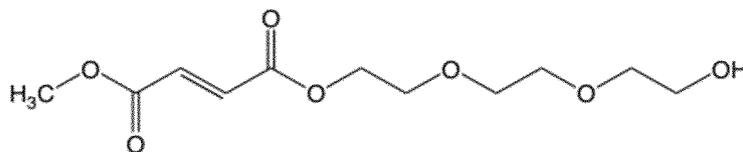
25 En una realización alternativa particularmente preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento, n es 2 y R es hidrógeno.

En una realización alternativa particularmente preferida adicional de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento, n es 3 y R es hidrógeno.

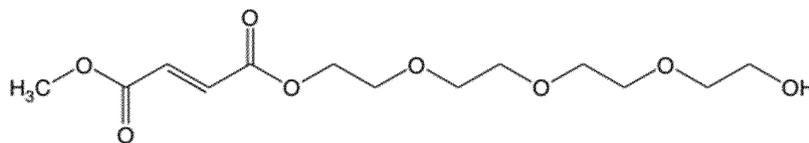
30 En una realización especialmente preferida, un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (II), (III) y (IV)



Fórmula (II)



Fórmula (III)



Fórmula (IV)

45 En una realización alternativa preferida, en un compuesto de Fórmula (I) para su uso como medicamento, R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃.

En una realización preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento, R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es 0, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

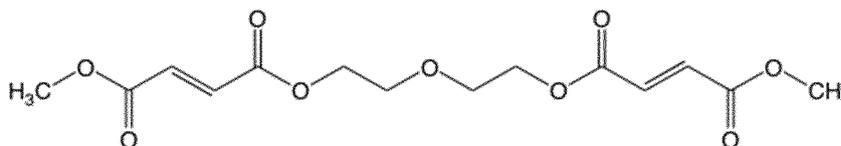
50 En una realización particularmente preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su

uso como medicamento, n es 1 y R es trans -CO-CH=CH-COOCH.

En una realización alternativa particularmente preferida de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento, n es 2 y R es trans -CO-CH=CH-COOCH.

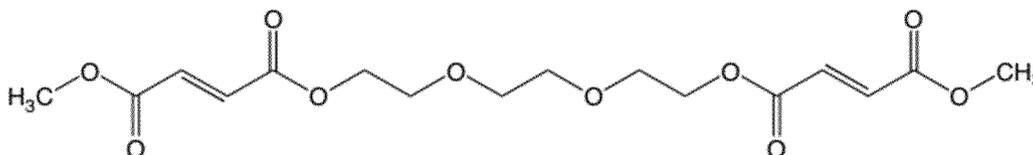
5 En una realización alternativa particularmente preferida adicional de la invención, en un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento, n es 3 y R es trans -CO-CH=CH-COOCH.

10 En una realización especialmente preferida, un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (V), (VI) y (VII)

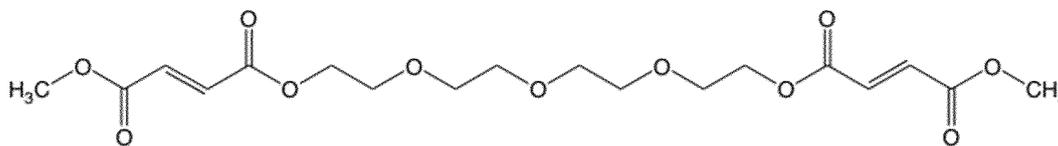


Fórmula (V)

15



Fórmula (VI)



Fórmula (VII)

20

25 Un sujeto adicional de la invención es un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) en donde R es hidrógeno o trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es un número entero de 0 a 10 o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias.

30 Para un compuesto anterior de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias, se aplica lo mismo que para un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento.

35 Las enfermedades sistémicas no solo afectan a los órganos individuales. En cambio, se sabe que estas enfermedades afectan a varios órganos y tejidos o incluso al cuerpo en su conjunto.

Las personas que tienen una enfermedad autoinmunitaria por lo general padecen que su sistema inmunitario ataca erróneamente sus propias células de su organismo y, por lo tanto, responde incorrectamente a las sustancias normalmente presentes en el cuerpo.

40 Una inflamación puede definirse como la respuesta del cuerpo a la aparición de estímulos nocivos que pueden provocar dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y pérdida de la función del órgano afectado.

Es posible que algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente no puedan asignarse a un solo grupo de los grupos mencionados anteriormente, puesto que muestran los síntomas de más de uno de ellos.

45

En una realización preferida adicional, el compuesto mencionado anteriormente de acuerdo con la Fórmula (I) es para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la psoriasis, preferentemente la esclerosis múltiple. Dichos compuestos pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento de los siguientes tipos de esclerosis múltiple: recidivante-remitente, primaria-progresiva, secundaria-progresiva y progresiva-recidivante. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se usan en el tratamiento de la esclerosis múltiple

50

recidivante-remitente.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención, es decir, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento y opcionalmente excipientes farmacéuticos.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende

(i) de 0,01 a 10 mmol, más preferentemente de 0,05 a 5 mmol, aún más preferentemente de 0,25 a 3,5 mmol y particularmente preferentemente de 0,5 a 2,5 mmol de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) para su uso como medicamento
(ii) excipiente o excipientes farmacéuticos.

En una realización preferida adicional, la presente composición puede comprender uno o más excipientes adicionales, preferentemente excipientes farmacéuticos como se describe en la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y/o en la Farmacopea de los EE.UU. (USP).

Son ejemplos de excipientes farmacéuticos vehículos, aglutinantes, cargas, disgregantes, agentes disipadores, agentes de deslizamiento y/o lubricantes.

En una realización preferida, los excipientes se eligen de manera que la formulación resultante sea una formulación resistente al jugo gástrico. En una realización preferida, la formulación de la presente invención no muestra liberación significativa de fármaco en condiciones ácidas. En particular, la liberación de fármaco *in vitro* después de 2 horas es inferior al 10 %, preferentemente del 0 al 9,9 %, más preferentemente del 0 al 5 %, aún más preferentemente del 0,001 al 3 %, medida de acuerdo con la USP, Aparato II, paleta, HCl 0,1 N, 37 °C, 50 rpm.

La composición farmacéutica puede estar en una forma adecuada para la administración oral, preferentemente en forma de un comprimido o cápsula, en particular en forma de un comprimido.

Se prefiere adicionalmente que el comprimido esté recubierto con un recubrimiento pelicular. Como alternativa, la cápsula también podría estar recubierta.

En la presente invención, son posibles los siguientes tres tipos de recubrimientos peliculares:

- recubrimiento pelicular que no afecta a la liberación del principio activo,
- recubrimientos peliculares resistentes al jugo gástrico,
- recubrimientos peliculares retardados.

En general, los recubrimientos peliculares pueden prepararse usando agentes formadores de película tales como ceras, derivados de celulosa, poli(met)acrilato, polivinilpirrolidona, acetato ftalato de polivinilo y/o goma laca o gomas naturales tales como carragenina.

Se prefiere que el comprimido presente esté recubierto con un recubrimiento pelicular resistente al jugo gástrico. Como alternativa, puede usarse una cápsula que comprenda un recubrimiento pelicular resistente al jugo gástrico.

El recubrimiento pelicular resistente al jugo gástrico es preferentemente un recubrimiento pelicular que es estable en el intervalo de pH de aproximadamente 0,7 a 3,0, que se supone que es el valor de pH del jugo gástrico humano que se encuentra en el estómago. Sin embargo, en un ambiente con un valor de pH de 5 a 9, que se supone que está presente en el intestino (delgado) del cuerpo humano, el recubrimiento pelicular resistente al jugo gástrico se disuelve preferentemente y puede liberarse el fármaco.

El recubrimiento pelicular resistente al jugo gástrico (con frecuencia también denominado recubrimiento entérico) puede comprender agentes formadores de película que son, por ejemplo, grasas, ácidos grasos, ceras, alginatos, goma laca, acetato ftalato de polivinilo, derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa, acetato succinato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropil metil celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato trimelitato de celulosa y copolímeros de ácido met(acrílico) tales como copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo-ácido metacrílico, Eudragit (por ejemplo, Eudragit® L30D, Eudragit® L, Eudragit® S).

El recubrimiento está preferentemente libre de ingrediente activo. Se prefiere adicionalmente que el espesor del recubrimiento sea por lo general de 10 µm a 2°mm, preferentemente de 50 a 500 µm.

El recubrimiento preferido puede comprender un agente formador de película y uno o más de los siguientes: lubricante, tensioactivo, agente de deslizamiento, pigmento y agua.

El recubrimiento preferido de acuerdo con una realización de la presente invención puede comprender, junto con el agente formador de película, por ejemplo, ácido esteárico como lubricante para plastificar y disolver el polímero, laurilsulfato sódico como tensioactivo para humedecer y disgregar, talco como agente de deslizamiento, óxido de hierro amarillo y/u óxido de titanio como pigmento o pigmentos y opcionalmente agua purificada.

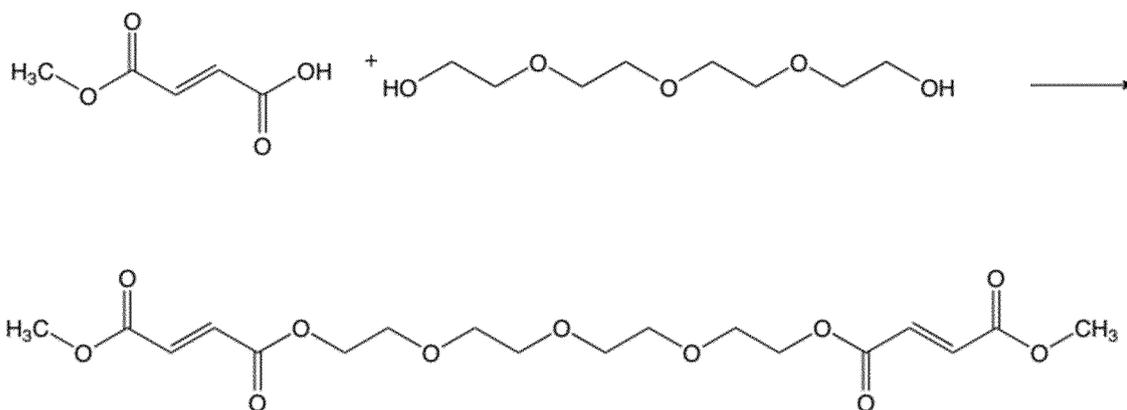
5 En una realización preferida, la composición farmacéutica puede administrarse de una a tres veces al día, preferentemente una o dos veces al día, más preferentemente una vez al día.

10 Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para tratar y/o prevenir enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias y/o enfermedades inflamatorias, preferentemente esclerosis múltiple, artritis reumatoide o psoriasis, en particular esclerosis múltiple, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, en particular un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) donde los restos se definen como anteriormente, o la composición farmacéutica de la invención. Para este compuesto y esta composición farmacéutica, se aplica la misma explicación (por ejemplo, con respecto a la combinación de posibles realizaciones) en cuanto al compuesto y la composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, respectivamente.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Éster metílico del éster 2-(2-{2-[2-((E)-3-metoxicarbonil-acrilóil-oxi)-etoxi]-etoxi)-etilico del ácido (E)-but-2-enodioico



25 Procedimiento A:
 Se suspendieron tetraetilenglicol (TEG, 3 g, 15,4 mmol), clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (EDC, 8,83 g, 46,3 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 0,09 g, 0,8 mmol) en THF seco (30 ml). Se disolvió fumarato de monometilo (4,82 g, 37,1 mmol) en THF (50 ml) y se añadió gota a gota a la suspensión de tetraetilenglicol. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a 23 °C durante 2,5 h. La capa orgánica se evaporó a 43 °C para producir un producto de tipo jarabe de color ligeramente marrón. El producto en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida (eluyente: acetato de etilo/n-hexano 4/1 (valor de Rf 0,75) para producir el producto (4,16 g; 64 %) en forma de un aceite incoloro, que se secó al vacío.
 35 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3,65 (s, 8 H) 3,74 (t, J = 4,69 Hz, 5 H) 3,80 (s, 6 H) 4,35 (t, J = 4,70 Hz, 4 H) 6,87 (s, 3 H)
 RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 52,3, 64,4, 68,9, 70,7, 133,5, 164,8, 165,3

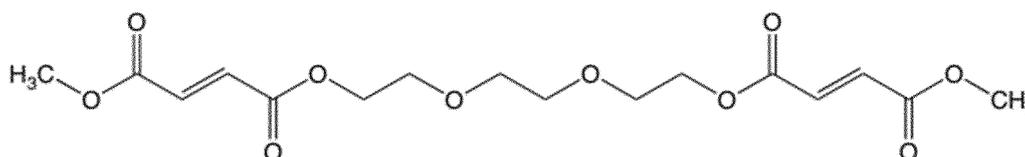
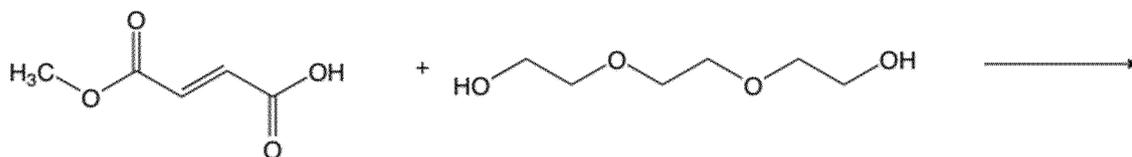
40 Procedimiento B

Se suspendieron tetraetilenglicol (TEG, 100 g, 0,51 mol), fumarato de monometilo (140,7 g, 1,08 mol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 6,29 g, 51,5 mmol) en diclorometano seco (1000 ml) a TA. Se añadió gota a gota una solución de dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 223,1 g, 1,08 mol) en diclorometano (300 ml) a 10 °C. Después de que se completase la adición, la mezcla de reacción se agitó a TA durante 0,5 h. La suspensión de color blanco se filtró y al filtrado se le añadió agua (1500 ml). Las fases se separaron y la capa de agua se extrajo dos veces con diclorometano (2x750 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (250 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron. El producto en bruto se disolvió en acetato de etilo (160 ml) a 60 °C y se añadió n-hexano lentamente a esta temperatura. Después de que se completase la adición, la mezcla se enfrió lentamente a TA y se enfrió en el frigorífico durante 16 h. La suspensión se filtró y se lavó con acetato de etilo/n-hexano (1:2) para producir 175,68 g en forma de un sólido de color amarillento. El sólido se suspendió en diisopropil éter (750 ml) a TA durante 20 h. Después de eso, el sólido se filtró y se secó en un desecador (TA/2 kPa (20 mbar)) durante 24 h para

producir un sólido de color blanco (155,2 g; 72 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3,53 (s, 8 H) 3,64 (t, J = 4,70 Hz, 5 H) 3,74 (s, 6 H) 4,26 (t, J = 4,70 Hz, 4 H) 6,76 (s, 3 H)

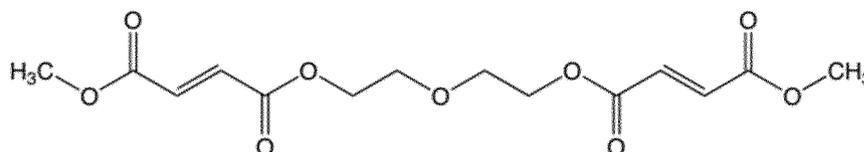
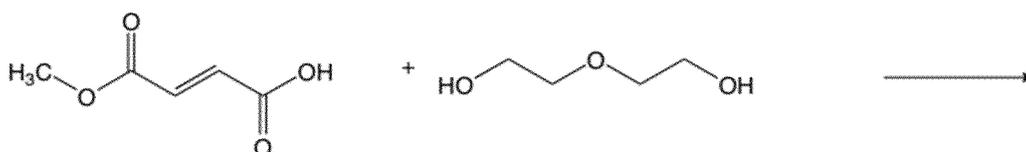
5 **Ejemplo 2: Éster metílico del éster 2-[2-[2-((E)-3-metoxicarbonil-acriloil-oxi)-etoxi]-etoxi]-etilico del ácido (E)-but-2-enodioico**



- 10 Se suspendieron trietilenglicol (3 g, 20,0 mmol), clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (11,49 g, 59,9 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (0,12 g, 1,0 mmol) en THF seco (55 ml). Se disolvió fumarato de monometilo (6,24 g, 47,9 mmol) en THF (70 ml) y se añadió gota a gota a la suspensión de trietilenglicol. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a 23 °C durante 2 h. La capa orgánica se evaporó a 40 °C para producir un producto de tipo jarabe de color ligeramente rosa/marrón. El producto en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida (eluyente: acetato de etilo/n-hexano 4/1 (valor de R_f 0,7) para producir el producto (5,44 g; 73 %) en forma de un sólido incoloro, que se secó al vacío.

15 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3,64 (s, 4 H) 3,71-3,76 (m, 4 H) 3,77-3,83 (m, 7 H) 4,29-4,40 (m, 4 H) 6,86 (s, 3 H)
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 52,3, 64,4, 68,9, 70,6, 133,4, 133,5, 164,8, 165,3

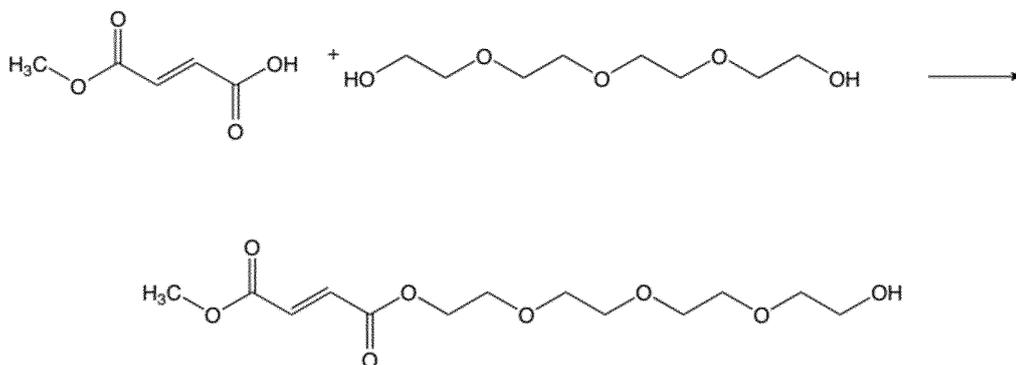
20 **Ejemplo 3: Éster metílico del éster 2-[2-((E)-3-metoxicarbonil-acriloiloxi)-etoxi]-etilico del ácido (E)-but-2-enodioico**



- 25 Se suspendieron dietilenglicol (3 g, 28,3 mmol), clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (16,3 g, 84,8 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (0,17 g, 1,4 mmol) en THF seco (70 ml). Se disolvió fumarato de monometilo (8,83 g, 67,8 mmol) en THF (100 ml) y se añadió gota a gota a la suspensión de dietilenglicol. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a 23 °C durante 2 h. La capa orgánica se evaporó a 41 °C para producir un producto de tipo jarabe de color ligeramente rosa/marrón. El producto en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida (eluyente: acetato de etilo/n-hexano 4/1 para producir el producto (5,9 g; 63 %) en forma de un sólido incoloro, que se secó al vacío.

30 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3,72-3,75 (m, 4 H) 3,79 (s, 6 H) 4,28-4,40 (m, 4 H) 6,86 (s, 4 H)
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 52,3, 64,2, 68,8, 133,3, 133,6, 164,8, 165,2

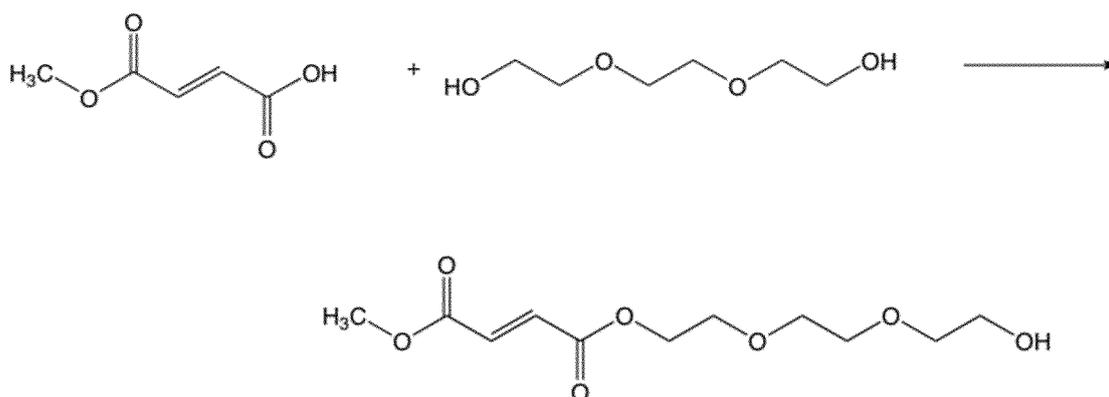
35 **Ejemplo 4: Éster metílico del éster 2-[2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etilico del ácido (E)-but-2-enodioico**



5 Se disolvieron tetraetilenglicol (8,96 g, 46,1 mmol), clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (3,54 g, 18,4 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (0,09 g, 0,8 mmol) en THF (20 ml). Se disolvió fumarato de monometilo (2 g, 15,4 mmol) en THF (30 ml) y se añadió gota a gota a la solución de tetraetilenglicol a 23 °C en 20 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a 23 °C durante 1,5 h. Se detuvo la agitación y se obtuvo una capa bifásica, se desechó la capa inferior y se evaporó la capa superior. El producto en bruto obtenido se sometió a cromatografía ultrarrápida con acetato de etilo al 100 % o acetato de etilo/n-hexano (4/1) para producir el producto en forma de un aceite incoloro (2,47 g; 53 %).

10 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2,73 (s, 1 H) 3,52-3,57 (m, 2 H) 3,61 (s, 8 H) 3,63-3,73 (m, 4 H) 3,75 (s, 3 H) 4,26-4,35 (m, 2 H) 6,76-6,92 (m, 2 H)

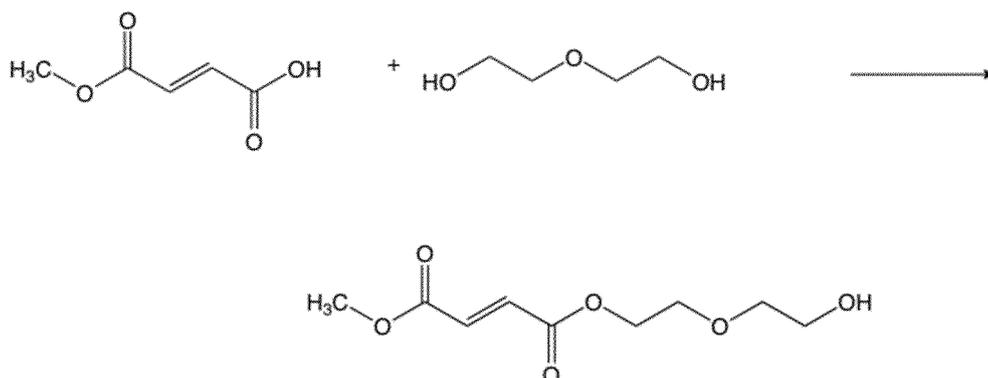
15 **Ejemplo 5: Éster metílico del éster 2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etilico del ácido (E)-but-2-enodioico**



20 Se disolvieron trietilenglicol (6,92 g, 46,1 mmol), clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (3,54 g, 18,4 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (0,09 g, 0,8 mmol) en THF (20 ml). Se disolvió fumarato de monometilo (2 g, 15,4 mmol) en THF (30 ml) y se añadió gota a gota a la solución de trietilenglicol a 23 °C en 20 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a 23 °C durante 1,5 h. Se detuvo la agitación y se obtuvo una capa bifásica, se desechó la capa inferior y se evaporó la capa superior. El producto en bruto obtenido se sometió a cromatografía ultrarrápida con acetato de etilo al 100 % o acetato de etilo/n-hexano (4/1) para producir el producto en forma de un aceite incoloro.

25

Ejemplo 6: Éster metílico del éster 2-(2-hidroxi-etoxi)-etilico del ácido (E)-but-2-enodioico



Se disolvieron dietilenglicol (4,89 g, 46,1 mmol), clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (3,54 g, 18,4 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (0,09 g, 0,8 mmol) en THF (20 ml). Se disolvió fumarato de monometilo (2 g, 15,4 mmol) en THF (30 ml) y se añadió gota a gota a la solución de dietilenglicol a 23 °C en 20 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a 23 °C durante 1,5 h. Se detuvo la agitación y se obtuvo una capa bifásica, se desechó la capa inferior y se evaporó la capa superior. El producto en bruto obtenido se sometió a cromatografía ultrarrápida con acetato de etilo al 100 % o acetato de etilo/n-hexano (4/1) para producir el producto en forma de un aceite incoloro.

RMN ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 2,46 (s, 1 H) 3,53-3,59 (m, 2 H) 3,69 (s, 4 H) 3,75 (s, 3 H) 4,31 (m, J = 4,70, 4,70 Hz, 2 H) 6,82 (s, 2 H)

Ejemplo 7: Investigación y comparación de la cinética de la liberación de MMF de los diferentes compuestos de la presente invención y DMF durante la incubación en líquido intestinal de minicerdo

7.1 Material

7.1.1 Compuestos de ensayo

Se sintetizaron compuestos de la presente invención como se ha descrito anteriormente.

7.1.2 Líquido intestinal

Se tomaron muestras de tejido/líquido intestinal y enterocitos de un minicerdo SPF Göttingen de 10 meses de edad. El peso corporal era de 21 kg. El minicerdo estuvo en ayunas durante aproximadamente 28 horas antes del muestreo de líquido/tejidos intestinales y enterocitos. El día del muestreo, el minicerdo se pesó y se anestesió mediante una inyección intramuscular en el cuello o en la pata trasera izquierda (aproximadamente 0,3 ml por kg de peso corporal) de una mezcla de Zoletil 50 Vet., Virbac, Francia (125 mg de tiletamina y 125 mg de zolazepam), Rompun Vet., Bayer, Alemania (20 mg de xilazina/ml, 6,5 ml), Ketaminol Vet., Veterinaria AG, Suiza (100 mg de ketamina/ml, 1,5 ml) y Metadona DAK, Nycomed Danmark, Dinamarca (10 mg de metadona/ml, 2,5 ml). El animal se sacrificó mediante desangrado antes del muestreo de líquido intestinal. Se ligó un segmento intestinal en ambos extremos antes de la extracción. El tejido aislado se colocó en solución salina isotónica y se abrió mediante un corte longitudinal para tomar muestras de líquido intestinal.

El tejido intestinal de cada segmento se transfirió a un tubo de centrifuga, se sumergió en 10 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 6,8 y se congeló a -70 °C.

7.2 Métodos analíticos

7.2.1 Cuantificación de MMF mediante CL-EM

7.2.1.1 Instrumento analítico

Instrumento: Sistema UPLC Acquity junto con un detector TQ (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo)

Método UPLC:

Columna: Phenomenex Kinetex C18, 100A, 2,6 µm (150 x 4,6°mm)
 flujo: 0,4 ml/min
 separación: aprox. 100 µl/min a EM
 Temperatura: 30 °C
 sistema disolvente (isocrático):
 Disolvente A agua al 25 % con ácido acético al 0,1 %
 Disolvente B metanol al 75 % con ácido acético al 0,1 %
 tiempo de espera: 6 min
 temperatura del automuestreador: 8 °C
 volumen de inyección: 4 µl
 tiempo de retención: MMF: 4,3 min
 MEF: 4,7 min

Espectrometría de masas

software: Masslynx 4.1
 modo de detección: electronebulización/iones negativos (EN-)
 voltaje capilar: 2,3 kV
 temperatura de la fuente: 100 °C
 temperatura de desolvatación: 450 °C
 voltaje del cono: 18 V
 gas de desolvatación: N₂, 650 l/h
 gas del cono: N₂, 20 l/h
 gas de colisión: argón, aprox. 3,3*10⁻⁴ kPa (3,3*10⁻³ mbar)
 energía de colisión: 11 eV
 MRM [m/z]: 128,94 > 85,03 permanencia de fumarato de monometilo: 200 ms
 142,99 > 99,06 permanencia de fumarato de monometilo (PI): 200 ms

7.2.1.2 Soluciones madre y de calibración

5 Se prepararon soluciones madre (SM), de trabajo (ST) y de calibración del analito fumarato de monometilo (MMF) y el patrón interno (PI) de fumarato de monometilo (MEF) como se describe a continuación.

- 10 SM_{MMF}: En un matraz volumétrico de 10 ml, se disolvieron 6,5 mg de MMF (Lote: MKRJ0642V/Aldrich) en metanol y se completó el volumen (c = 650 µg/ml)
 SM_{PI}: En un matraz volumétrico de 100 ml, se disolvieron 10 mg de MEF (Lote: STBC5219V/Aldrich) en metanol y se completó el volumen (c = 100 µg/ml)
 ST_{PI}: se transfirieron 100 µl de SM_{PI} a un matraz volumétrico de 10 ml y se completó el volumen con acetonitrilo (c = 1.000 ng/ml);

15 Se prepararon soluciones de calibración mediante dilución en serie de SM_{MMF}; se usó líquido diluido de intestino delgado como matriz (diluido en 1/20 v/v con KH₂PO₄ 50°mM, pH 6,8; (LI dil)). El esquema de dilución se proporciona a continuación:

solución de calibración	Preparación		Concentración	
			[ng/ml]	[µM]
cal6500	8 µl de SM _{MMF}	+ 792 µl de LI dil	6.500	50
cal3250	50 µl de cal6500	+ 50 µl de LI dil	3250	25
cal650	20 µl de cal6500	+ 180 µl de LI dil	650	5,0
cal325	50 µl de cal650	+ 50 µl de LI dil	325	2,5
cal65	10 µl de cal650	+ 90 µl de LI dil	65	0,5

20 **7.2.1.3 Preparación de la muestra**

Se mezclaron 50 µl de muestra (solución de calibración o muestra de un experimento de incubación con profármacos de MMF) con 50 µl de ST_{PI}, 20 µl de ácido fórmico y 100 µl de acetonitrilo. Esta mezcla se agitó con

formación de vórtice durante 15 s y se centrifugó (13.000 rpm, 3 min). A continuación, se sometieron 4 µl del sobrenadante a análisis por CL-EM.

7.2.2 Experimentos de incubación con DMF (referencia) y compuestos de la invención

7.2.2.1 Soluciones madre

Se prepararon soluciones madre en DMSO o, para un compuesto, en DMSO con agua al 10 % (v/v). Las concentraciones en las soluciones madre fueron 5,00, 2,50 y 1,67 mmol para compuestos con uno, dos y tres equivalentes molares de MMF.

Compuesto	PM	Peso de la muestra [mg]	disuelto en	Concentración	
				[mg/ml]	[mmol]
DMF	144,13	7,21	10 ml de DMSO	0,721	5,00
Ejemplo 1	418,40	5,29	5 ml de DMSO	1,058	2,50
Ejemplo 2	374,35	4,68	5 ml de DMSO	0,936	2,50
Ejemplo 3	330,29	4,13	5 ml de DMSO	0,826	2,50

7.2.2.2 Experimento de incubación

En un vial de vidrio de HPLC, se mezclaron 8 µl de solución madre con 792 µl de LI dil y la mezcla se agitó (250 rpm) en un baño de agua (T = 37 °C).

Inmediatamente después de mezclar, así como a t = 15 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min, se retiraron 50 µl y se prepararon para el análisis por CL-EM como se describe en el capítulo. 2.1.3.

Se continuaron las incubaciones y en caso de que el resultado del análisis de los 120 min indicase la presencia de profármaco de MMF intacto restante, se tomaron muestras adicionales (t = 360 o 420 min y a 1.260 o 1.320 min) y se analizaron.

7.3 Resultados

7.3.1 Calibración del método analítico

Cada solución de calibración se analizó dos veces. El segundo análisis se realizó aprox. 18 h después del almacenamiento de la muestra en el automuestreador, que se enfrió a 8 °C. Los resultados demuestran que la relación del área de pico permanece esencialmente sin cambios entre el primer y el segundo análisis.

Los pares de datos de la relación concentración/área de pico se sometieron a análisis de regresión con ponderación 1/x y la ecuación de calibración resultante se usó para cuantificar el contenido de MMF en muestras de incubación.

patrón de calibración	concentración nominal [ng/ml]	Análisis	área/área (PI)	media	DTR
cal6500	6.500	1 ^{er} análisis	3,569	3,567	0,07
		2 ^{do} análisis	3,564		
cal3250	3.250	1 ^{er} análisis	1,710	1,681	1,73
		2 ^{do} análisis	1,652		
cal650	650	1 ^{er} análisis	0,348	0,347	0,29
		2 ^{do} análisis	0,346		
cal325	325	1 ^{er} análisis	0,174	0,169	2,96
		2 ^{do} análisis	0,164		
cal65	65	1 ^{er} análisis	0,036	0,035	2,86
		2 ^{do} análisis	0,034		
cal0	0	1 ^{er} análisis	0,000	0,000	0,00
		2 ^{do} análisis	0,000		

Como puede observarse en la Figura 1, los compuestos de la invención de acuerdo con los Ejemplos 1, 2 y 3, que llevan dos equivalentes de MMF, muestran una hidrolización modificada con respecto a la de DMF. En particular, la cinética de liberación del primer equivalente de MMF fue esencialmente idéntica con respecto a la de DMF (tiempo

0-30 min) mientras que el segundo equivalente se liberó más lentamente.

Ejemplo 8: Farmacología *In vivo*

- 5 Evaluación y comparación de la eficacia de los compuestos de la invención y DMF (referencia) en encefalomiелitis autoinmunitaria experimental inducida por MOG₃₅₋₅₅ (EAE) en ratones C57BL/6:

Sistema de ensayo: ratones C57BL/6 machos, 12 semanas de edad; 10 animales por grupo de tratamiento;
 Inducción de EAE: Día - 1 - inyección subcutánea de MOG35-55, suspendida en adyuvante completo de Freund e inyección intraperitoneal de toxina pertúsica.
 Día 3 - inyección intraperitoneal de toxina pertúsica.

Tratamiento: Se administraron fumarato de dimetilo y sustancias de ensayo o vehículo solamente por vía oral. Se disolvieron o se suspendieron sustancias de ensayo en hidroxietilcelulosa al 0,5 % (disueltas en dihidrogenofosfato de potasio 50°mM, pH 5,0). Concentración del fármaco en formulaciones de dosis: 11,54°mM;

Volumen de dosis: 10 ml/kg de peso corporal;
 Inicio del tratamiento: Día 1
 Observaciones (puntuación clínica y peso corporal): Se registraron las observaciones a diario entre los días 1 y 13.
 Puntuación clínica: grado 0 - 10; 0 (= sin alteraciones), 1 (movimiento normal; cola flácida: 2/3 proximales de la cola están flácidos y caídos), 2 (movimiento normal; toda la cola está flácida); 3 (marcha tambaleante; reflejo de enderezamiento ausente), 4 (ataxia de la marcha), 5 (paraparesia leve), 6 (paraparesia moderada), 7 (paraparesia grave o paraplejia), 8 (tetraparesia), 9 (moribundo), 10 (muerte).

- 10 Los resultados se muestran en la Figura 2 (peso corporal) y la Figura 3 (puntuación clínica). Con el tratamiento de animales con vehículo solamente, se observaron los primeros síntomas el día 8 (3 de 10 animales; puntuación clínica media: 0,4) y el estado empeoró hasta el día 13 (todos los animales se vieron afectados; puntuación clínica: 4,6). Por el contrario, el tratamiento profiláctico de los animales con DMF o compuesto de Ejemplo 1 protegió del desarrollo de síntomas clínicos y el peso corporal permaneció estable.

15 Ejemplo 9: Permeabilidad de membrana

La permeabilidad de membrana se investigó en monocapas de células Caco-2. Se investigó DMF en un experimento separado para la comparación.

- 20 Basándose en la suposición de que *in vivo*, la molécula intacta se metabolizará de forma presistémica, el ensayo de permeabilidad

se realizó solo en la dirección apical → basolateral. La concentración de ensayo en el medio apical fue de 250 µM. El ensayo se validó controlando la integridad de membrana con amarillo Lucifer (integridad postexperimental) y determinando la permeabilidad de atenolol (baja permeabilidad), testosterona (alta permeabilidad) y eritromicina (sustrato de Pgp). Además, se esperaba un metabolismo o degradación significativos del compuesto de ensayo y, por lo tanto, el compuesto original, así como el MMF, se determinaron en el compartimento aceptor (medio basolateral). Los puntos temporales de muestreo fueron 15, 45 y 90 min.

- 30 Los resultados se resumen a continuación:

Artículo	Dirección	Pap x 10 ⁻⁶ [cm/s] media ± d.t. (CV)	Recuperación [%] media ± d.t. (CV)	Relación de flujo de salida (b-a/a-b)
Atenolol	a-b	0,3 ± 0,1 (45,5 %)	104,1 ± 3,1 (3,0 %)	2,7
	b-a	0,8 ± 0,2 (23,6 %)	103,3 ± 5,5 (5,3 %)	
Eritromicina	a-b	0,1 ± 0,2 (161,8 %)	91,0 ± 1,9 (21 %)	100,8
	b-a	12,3 ± 0,4 (2,9 %)	99,9 ± 2,4 (2,4 %)	
Testosterona	a-b	18,2 ± 2,2 (11,9 %)	67,3 ± 1,2 (18 %)	2,7
	b-a	49,5 ± 1,3 (2,7 %)	94,9 ± 0,9 (0,9 %)	
Ejemplo 1	a-b	1,0 ± 0,1 (11,1 %)	17,1 ± 0,4 (2,3 %)	N/A
Atenolol	a-b	0,3 ± 0,1 (30,0 %)	101,6 ± 3,2 (3,1 %)	2,8
	b-a	1,0 ± 0,1 (9,2 %)	95,0 ± 5,3 (5,5 %)	
Eritromicina	a-b	0,2 ± 0,02 (12,0 %)	107,7 ± 22 (2,1 %)	55,9

Artículo	Dirección	Pap x 10 ⁻⁶ [cm/s] media ± d.t. (CV)	Recuperación [%] media ± d.t. (CV)	Relación de flujo de salida (b-a/a-b)
	b-a	11,5 ± 0,5 (4,0 %)	89,1 ± 8,5 (9,5 %)	
Testosterona	a-b	16,2 ± 1,6 (9,8 %)	62,5 ± 2,1 (3,4 %)	1,9
	b-a	30,7 ± 1,7 (5,7 %)	76,1 ± 4,5 (6,0 %)	
DMF	a-b	1,8 ± 0,2 (12,3 %)	11,6 ± 1,0 (8,2 %)	N/A

La permeabilidad aparente media de los compuestos de ensayo expresada como $P_{ap} \times 10^{-6}$ fue de $1,8 \pm 0,2$ cm/s para DMF y de $1,0 \pm 0,1$ cm/s para el Ejemplo 1. En comparación con las moléculas de referencia, DMF y el compuesto del Ejemplo 1 pueden clasificarse como fármacos de permeabilidad moderada. La recuperación de todos los compuestos de ensayo y de referencia fue similar (11,6 % para DMF, 17,1 % para el compuesto del Ejemplo 1), lo que indica una susceptibilidad similar a la hidrólisis.

Ejemplo 10: Farmacocinética *in vivo*

La farmacocinética de MMF después de la administración del compuesto del Ejemplo 1 y DMF para la comparación se investigó en ratones RMNI hembras (3 animales por grupo). El compuesto de ensayo se disolvió en DMSO/PEG300 (20/80) y se administró p.o. (sonda) a un volumen de dosis de 10 ml/kg. Se administró DMF a una dosis de 45 mg/kg. El compuesto de ensayo se dosificó a una dosis equivalente de MMF,

es decir, 65,3 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre a 0,25, 0,5, 1, 6,0 y 8,0 h después de la administración del fármaco.

Los perfiles de concentración media frente al tiempo de MMF en la escala lineal y semilogarítmica se muestran en la Figura 5.

animal n.º	C _{máx} [ng/ml]	T _{máx} [h]	AUC _{último} [ng*h/ml]	t _½ [h]	AUC _{inf} [ng* h/ml]	AUC _{%Extrap} [%]	F* [%]
1	6.860	0,25	5.120	0,49	5.140	0,36	73,1
2	6.700	0,25	6.040	1,02	6.080	0,69	86,5
3	12.700	0,25	6.550	1,56	6.750	3,03	96,0
media:	8,753	0,25	5,903	1,02	5,990	1,36	85
d.t.:	3,419	0,00	725	0,54	809	1,45	12
C.V.:	39 %	0 %	12 %	52 %	14 %	107 %	14 %

*: F = biodisponibilidad de MMF con respecto a la administración de DMF

y de DMF para comparación:

animal n.º	C _{máx} [ng/ml]	T _{máx} [h]	AUC _{último} [ng*h/ml]	t _½ [h]	AUC _{inf} [ng*h/ml]	AUC _{%Extrap} [%]	F [%]
4	13.000	0,25	6.750	1,13	6.800	0,79	N/A
5	7.330	0,25	7.630	2,83	7.710	1,00	N/A
6	6.640	0,25	6.530	0,96	6.580	0,81	N/A
media:	8.990	0,25	6.970	1,64	7.030	0,87	N/A
d.t.:	3.490	0,00	582	1,03	599	0,12	N/A
C.V.:	39 %	0 %	8 %	63 %	9 %	14 %	N/A

La tasa y el grado de exposición sistémica de animales a MMF después de la administración de los diferentes compuestos fueron muy similares. En comparación con la biodisponibilidad de MMF después de la administración de DMF, la biodisponibilidad relativa de MMF después de la administración del compuesto de ensayo (Ejemplo 1) fue del 85 %.

Ejemplo 11: Efecto de los profármacos de MMF de acuerdo con el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 sobre la inflamación de la piel similar a la psoriasis inducida por Imiquimod

Ratones BALB/c (n = 6 por grupo de tratamiento), de 8 a 10 semanas de edad, recibieron una dosis tópica diaria de

65 mg de crema de IMQ disponible en el mercado (5 %) (Aldara; 3M Pharmaceuticals) sobre el lomo rasurado durante 8 días consecutivos (del día 1 al día 8).

Los artículos de ensayo (Ejemplo 1 y Ejemplo 2) se administraron por vía oral dos veces al día entre el día 5 y el día 8 a una dosis de 15 mg/kg. Para la administración del compuesto de acuerdo con el Ejemplo 1, el compuesto sólido se disolvió en hidroxietilcelulosa al 0,5 % (en KH_2PO_4 50 mM, pH 5,0) a una concentración de 2,18 mg/ml. Para la administración del compuesto de acuerdo con el Ejemplo 2, se disolvió 1 vol. de una solución madre (19,5 mg/ml en DMSO) con 9 vol. de hidroxietilcelulosa al 0,5 % (en KH_2PO_4 50 mM, pH 5,0). El volumen de la dosis fue de 10 ml/kg.

El efecto del tratamiento con vehículo solamente, con anticuerpo anti-TNF administrado por vía intravenosa (= control positivo) o con los artículos de ensayo se evaluó el día 9. La gravedad de la inflamación de la piel del lomo se determinó usando el sistema de puntuación IAPG (índice de área de psoriasis y gravedad) como se indica a continuación: 0 = piel normal del ratón; 1 = enrojecimiento leve; 2 = eritema; 3 = eritema, hinchazón; 4 = eritema, hinchazón, descamación; 5 = eritema, hinchazón, descamación, lesiones (con sangre).

Además, se determinaron citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-27) y quimiocinas (IP-10 y GRO- α) en suero de muestras de sangre, que se extrajeron el día 9.

En la Figura 6 se muestra el efecto del tratamiento con vehículo (v.o., dos veces al día), anticuerpo anti-TNF α (i.v., dos inyecciones en total), así como sustancias de ensayo (de acuerdo con el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, v.o. dos veces al día, 15 mg/kg) en la puntuación IAPG en psoriasis inducida por Imiquimod en ratones Balb/c.

En las Figuras 7a a 7e se muestra el efecto del tratamiento con vehículo (v.o., dos veces al día), anticuerpo anti TNF α (i.v., dos inyecciones en total), así como sustancias de ensayo (de acuerdo con el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, v.o. dos veces al día, 15 mg/kg) sobre las concentraciones séricas de citocinas y quimiocinas (Figura 7a (IFN- γ), 7b (TNF- α), 7c (IL-27), 7d (IP-10) y 7e (GRO- α) en inducida por Imiquimod psoriasis en ratones Balb/c. Se extrajeron muestras de sangre 1 h y 4 h después de presentar el tratamiento final.

Ejemplo de referencia: comparación de la cinética de la liberación de MMF de éster metílico del éster 1-((E)-3-metoxi-carbonil-acrililoixi)-etílico del ácido (E)-but-2-enodioico de acuerdo con el ejemplo 45 del documento WO2010022177 (US20100048651) y DMF durante la incubación en el líquido intestinal del minicerdo

Se añadió éster metílico del éster 1-cloro-etílico del ácido (E)-2-enodioico:

Cloruro de cinc anhidro (0,1 g; 0,8 mmol) a éster metílico del ácido (E)-3-clorocarbonil-acrílico puro (5,6 g; 38 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió acetaldehído (2,5 ml; 45 mmol) gota a gota mientras se mantenía la temperatura por debajo de 20 °C. Después de que se completase la adición, la agitación continuó durante 1 h y después se inactivó con agua (15 ml) y NaHCO_3 acuoso (10 %; 6 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto restante se purificó a través de cromatografía en gel de sílice (eluyente: 10:1 v/v; n-heptano: MtBE) para producir 1,7 g (8,8 mmol; 23 %) de éster metílico del éster 1-cloro-etílico del ácido (E)-but-2-enodioico.

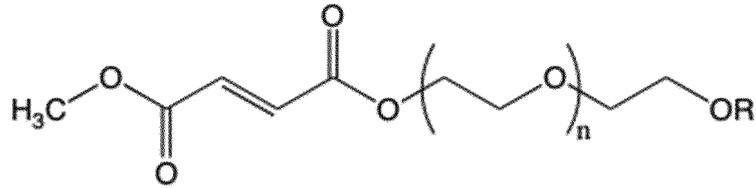
Éster metílico del éster 1-((E)-3-metoxycarbonil-acrililoixi)-etílico del ácido (E)-but-2-enodioico:

Una solución de fumarato de monometilo (1,72 g; 13,2 mmol) en *N*-metilpirrolidona (10 ml) se añadió al éster metílico del éster 1-cloro-etílico del ácido (E)-but-2-enodioico puro (1,7 g; 8,8 mmol) seguido de NaHCO_3 (0,96 g; 11,5 mmol). La suspensión resultante se calentó a 55 °C y se agitó durante 4 h. Debido a una conversión moderada, la temperatura de reacción se aumentó a 80 °C y la agitación continuó durante 12 h. Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y se lavó con agua (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró a presión reducida y el producto en bruto restante se purificó a través de cromatografía en gel de sílice (eluyente: 4:1 v/v; n-heptano: MtBE) para producir 0,79 g (2,8 mmol; 31 %) de un sólido incoloro.

Como puede observarse en la Figura 8, el éster metílico del éster 1-((E)-3-metoxycarbonil-acrililoixi)-etílico del ácido (E)-but-2-enodioico, que lleva un equivalente de MMF, muestra una hidrolización diferente con respecto a la de DMF. En particular, la cinética de liberación es considerablemente más rápida con respecto a la de DMF.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de acuerdo con la Fórmula (I)



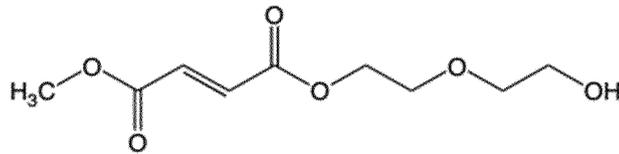
5

Fórmula (I),

10 en donde R es hidrógeno y n es un número entero de 1 a 10, o R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃ y n es un número entero de 2 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos.

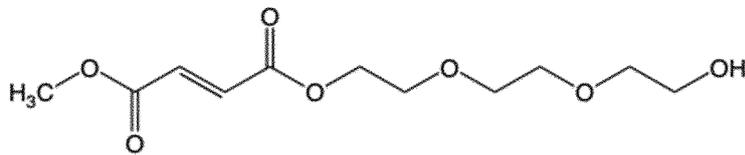
2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la Fórmula (I) R es hidrógeno y n es 1, 2 o 3.

15 3. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (II), (III) y (IV)



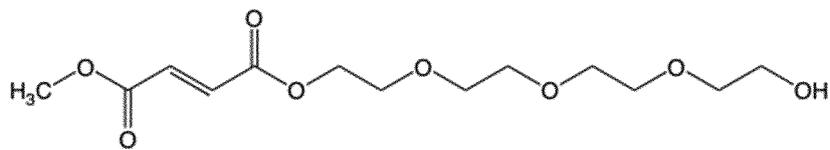
20

Fórmula (II)



25

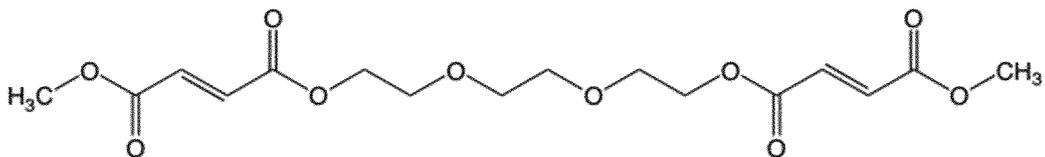
Fórmula (III)



Fórmula (IV)

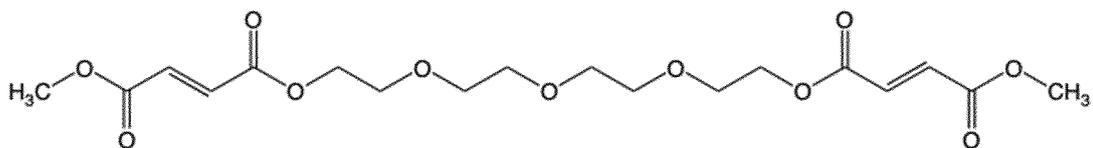
30 4. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la Fórmula (I) R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃.

5. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, en donde el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (VI) y (VII)



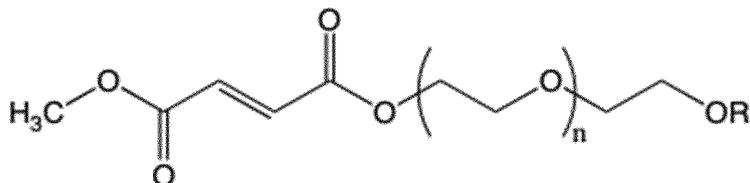
35

Fórmula (VI)



Fórmula (VII)

5 6. Compuesto de acuerdo con la Fórmula (I)



Fórmula (I),

10

en donde R es hidrógeno o trans -CO-CH=CH-COOCH₃, y n es un número entero de 0 a 10 o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos; para su uso como medicamento.

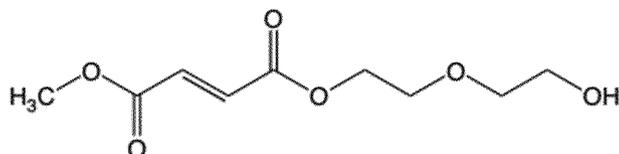
15

7. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde en la Fórmula (I) n es 1, 2 o 3.

8. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde en la Fórmula (I) R es hidrógeno.

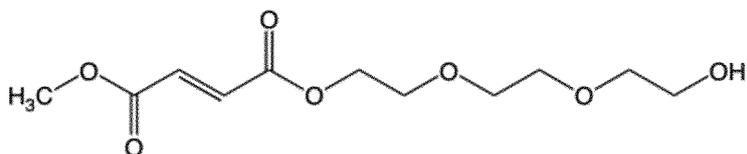
20

9. Compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (II), (III) y (IV)



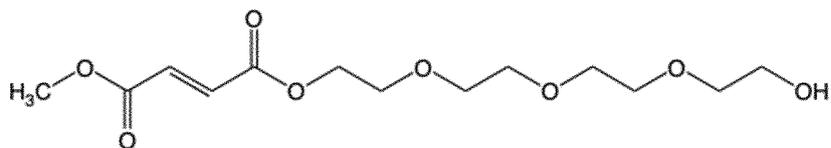
25

Fórmula (II)



30

Fórmula (III)



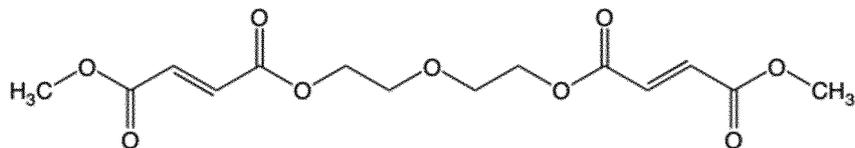
Fórmula (IV).

35

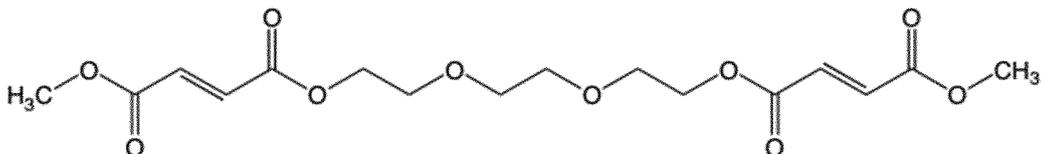
10. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde en la Fórmula (I) R es trans -CO-CH=CH-COOCH₃.

11. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 10, en donde el compuesto de acuerdo con la

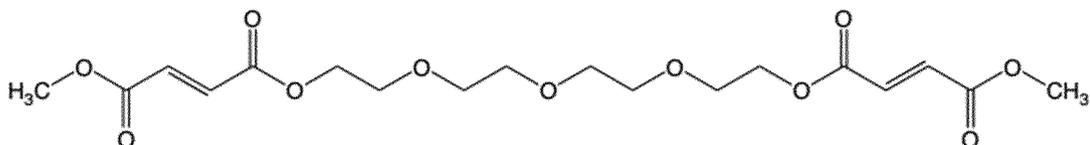
Fórmula (I) se selecciona entre los compuestos de acuerdo con las Fórmulas (V), (VI) y (VII)



5 Fórmula (V)

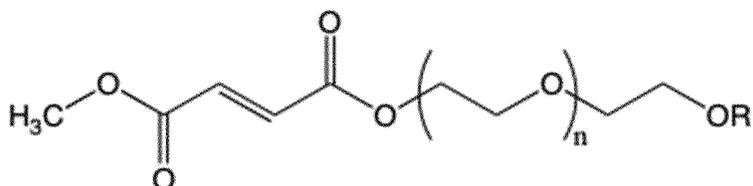


10 Fórmula (VI)



Fórmula (VII).

15 12. Compuesto de acuerdo con la Fórmula (I)



Fórmula (I),

20 en donde R es hidrógeno o *trans* -CO-CH=CH-COOCH₃, y
 n es un número entero de 0 a 10
 o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, polimorfo y/o mezclas de los mismos para su uso en el
 25 tratamiento de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias,
 preferentemente para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide o la psoriasis.

30 13. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12.

30 14. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende

- (i) de 0,01 a 10 mmol de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 y
- (ii) opcionalmente excipientes farmacéuticos.

35 15. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en donde la liberación del fármaco *in vitro* después de 2 horas es inferior al 10 %, medida de acuerdo con la USP, Aparato II, paleta, HCl 0,1, 37 °C, 50 rpm.

Figura 1

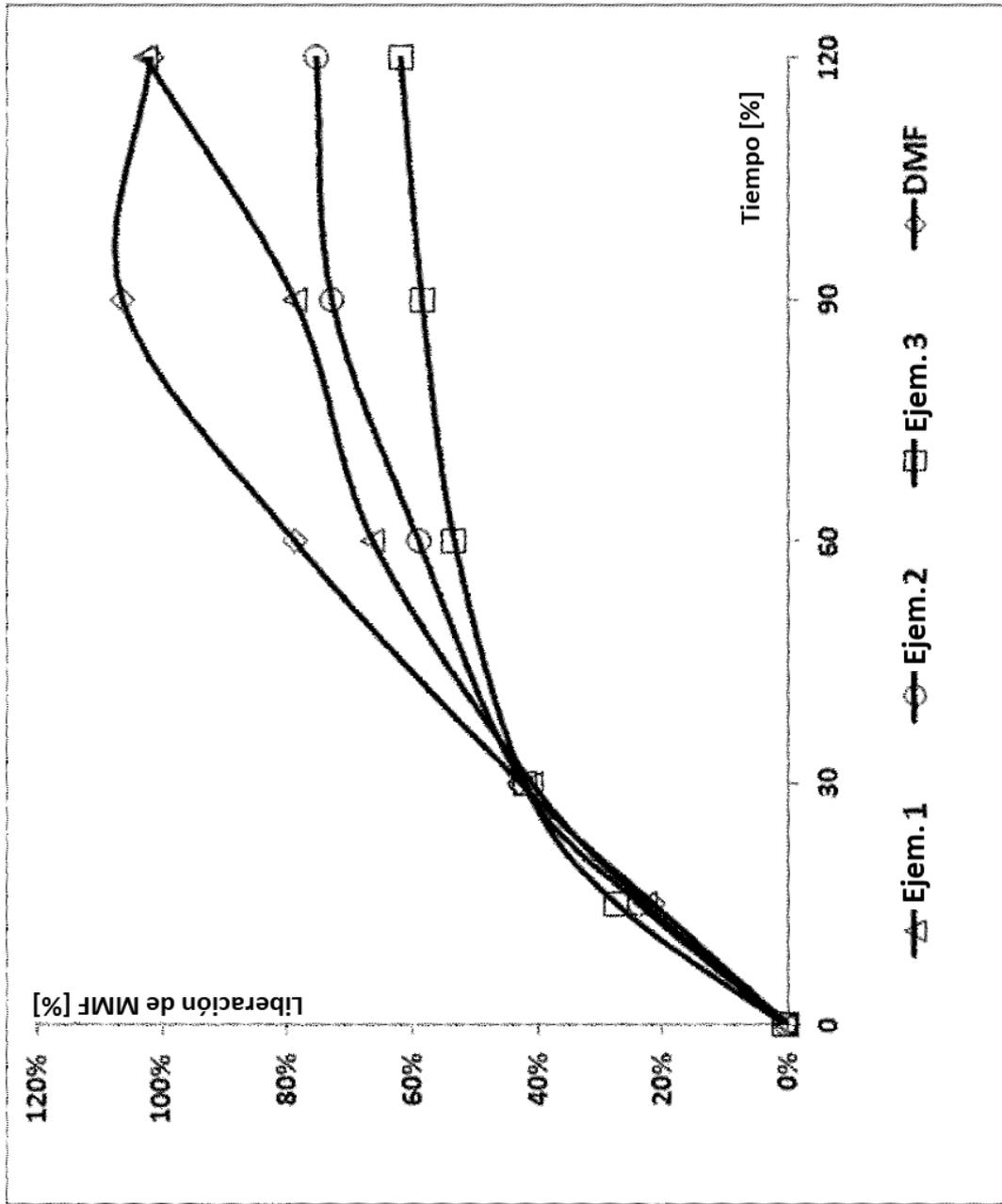


Figura 2

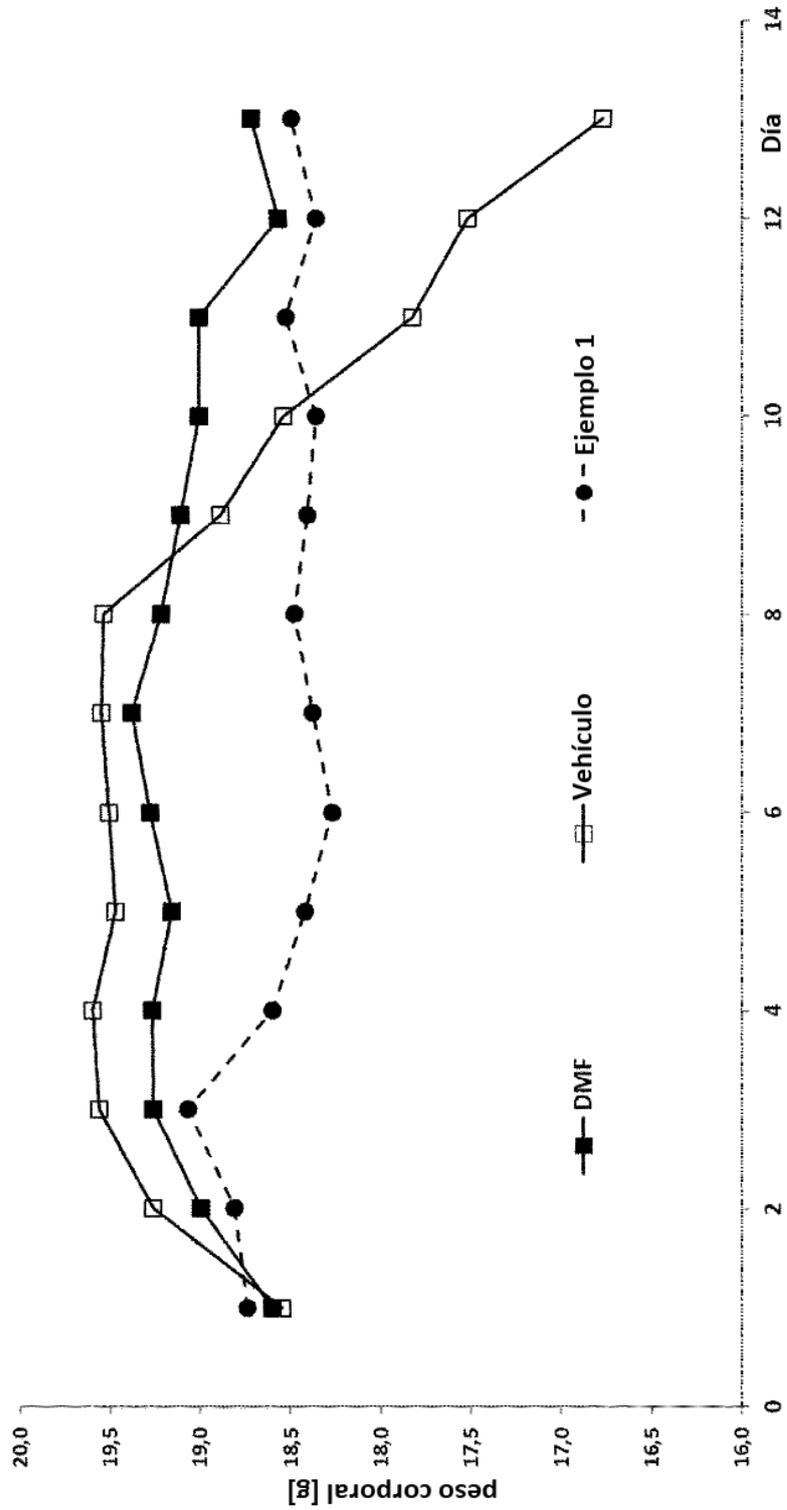


Figura 3

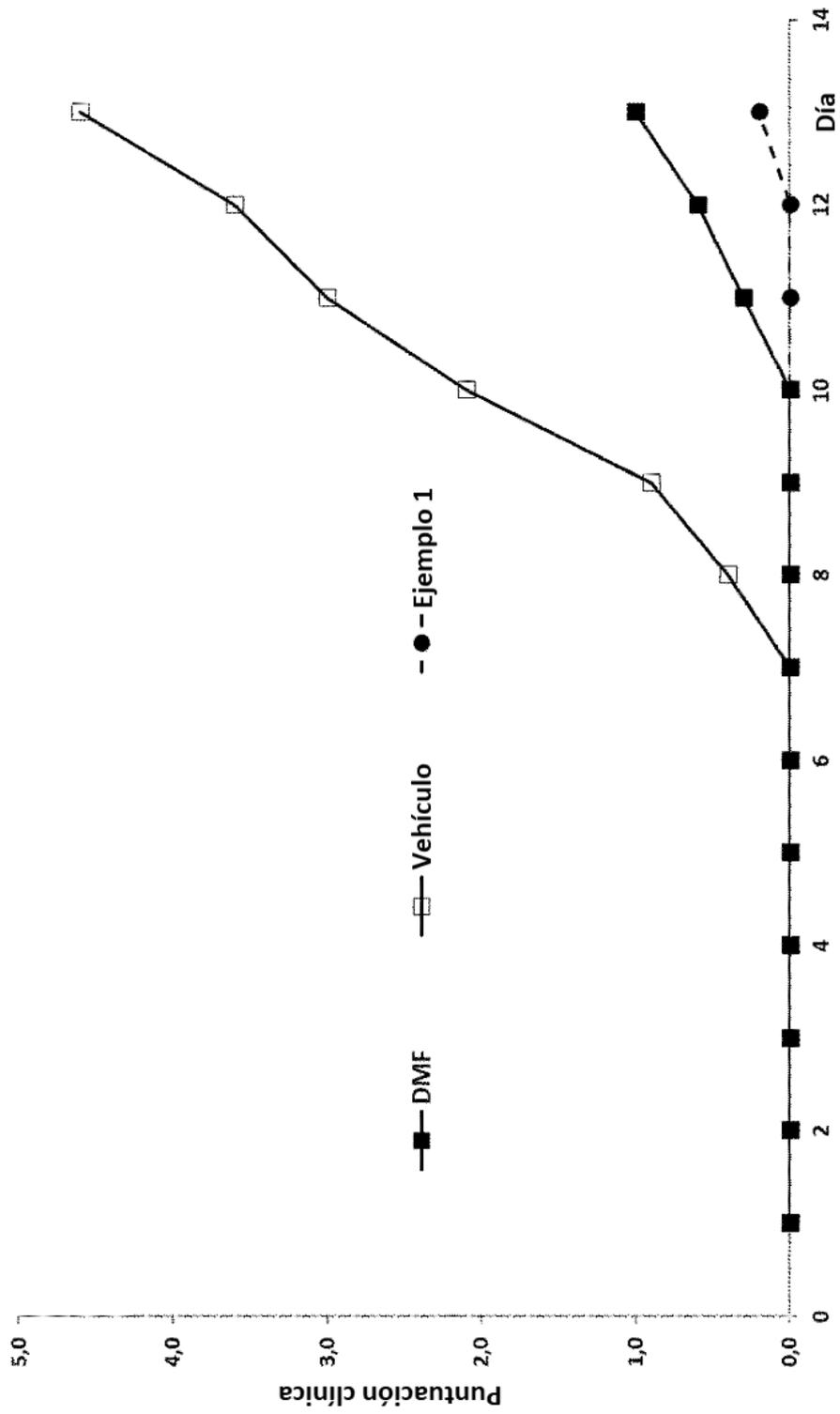


Figura 4

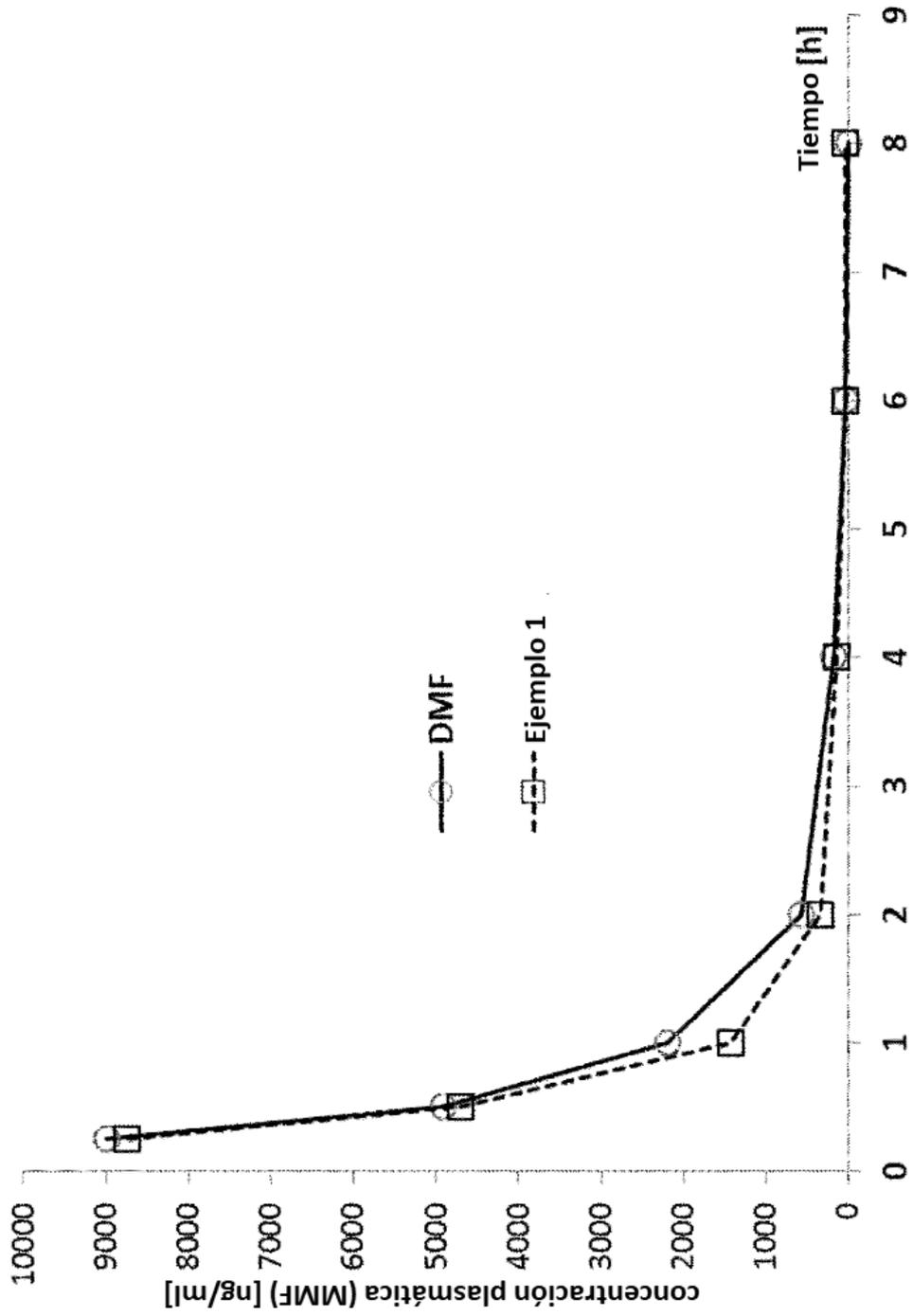


Figura 5

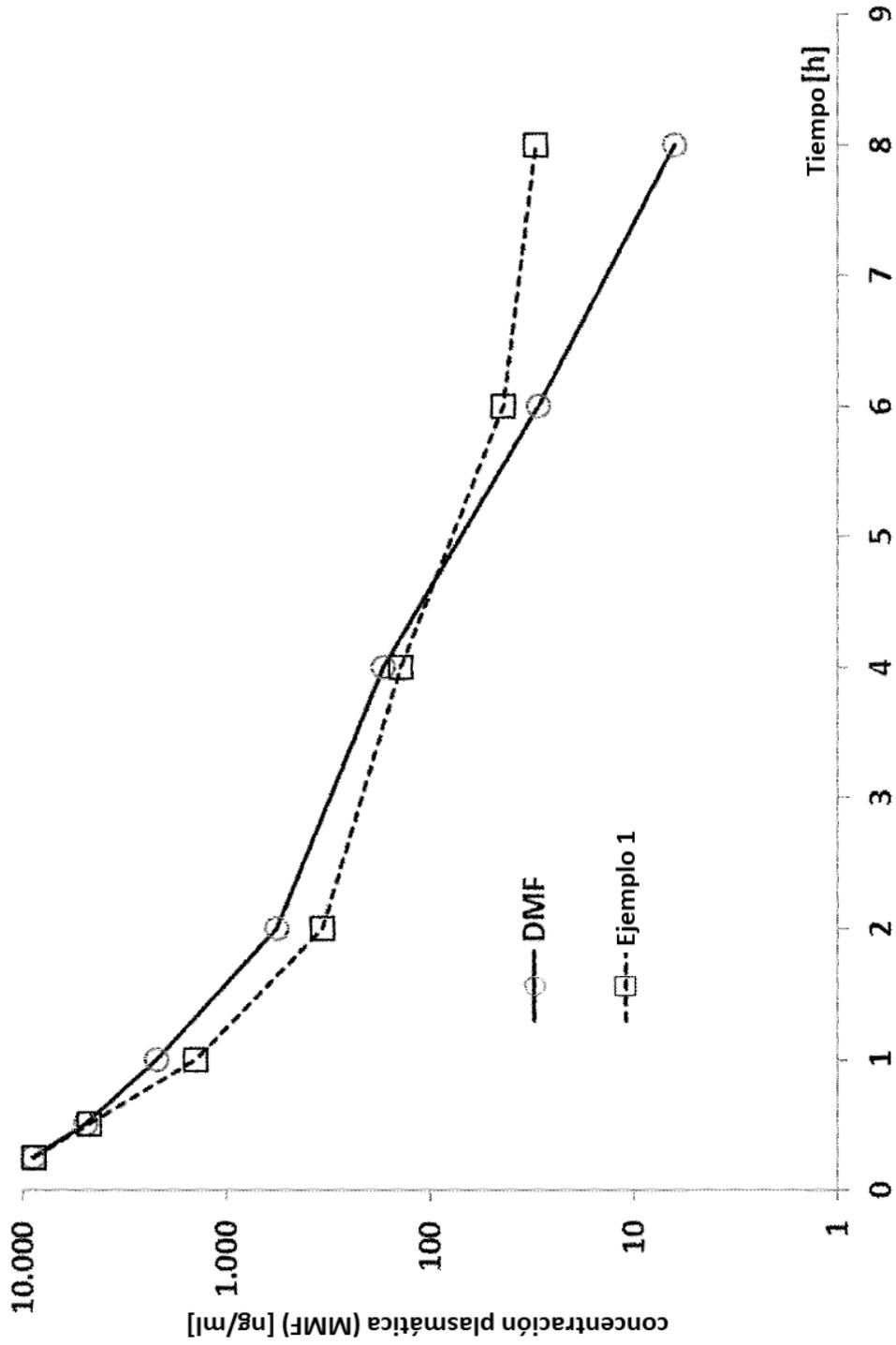


Figura 6

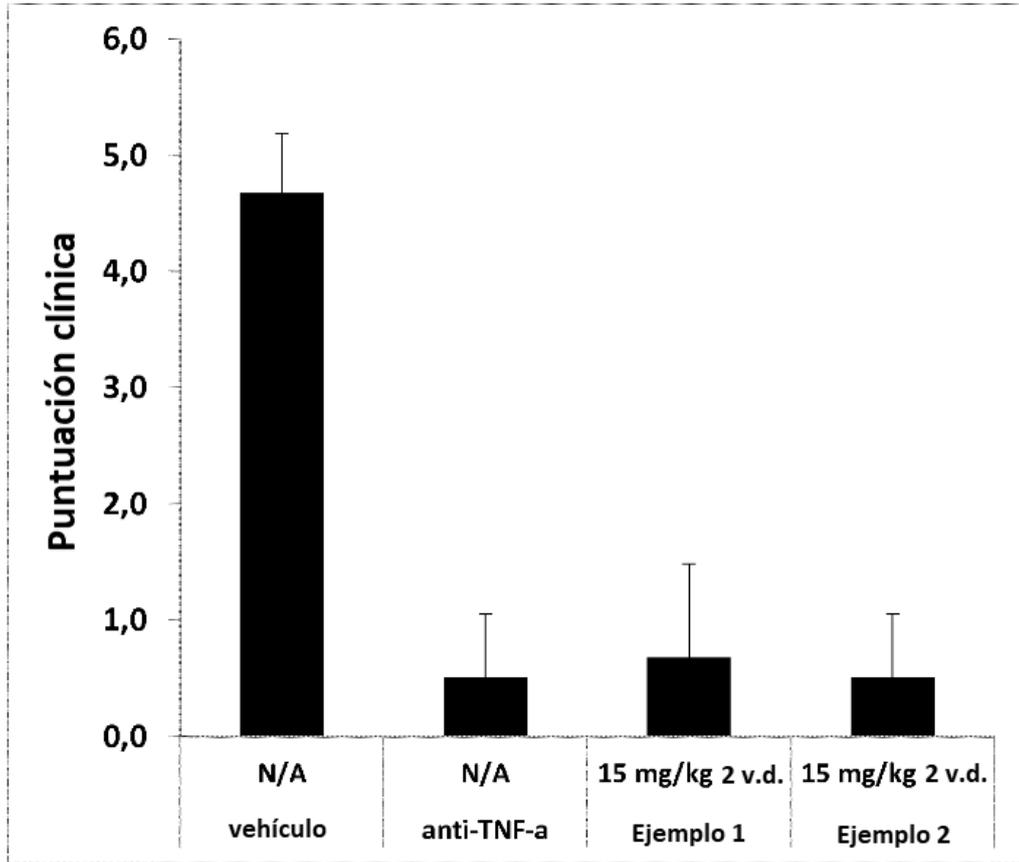


Figura 7a

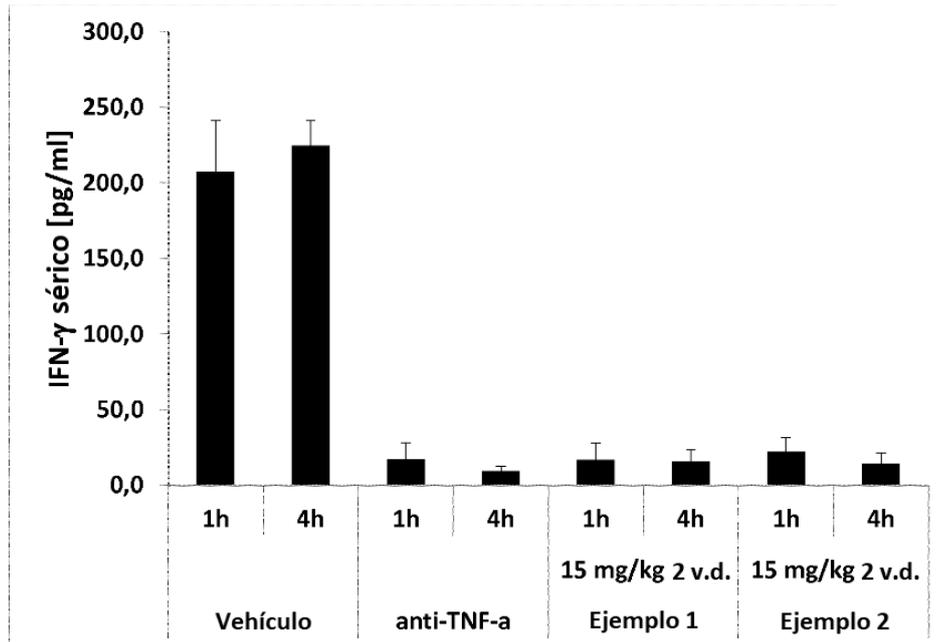


Figura 7b

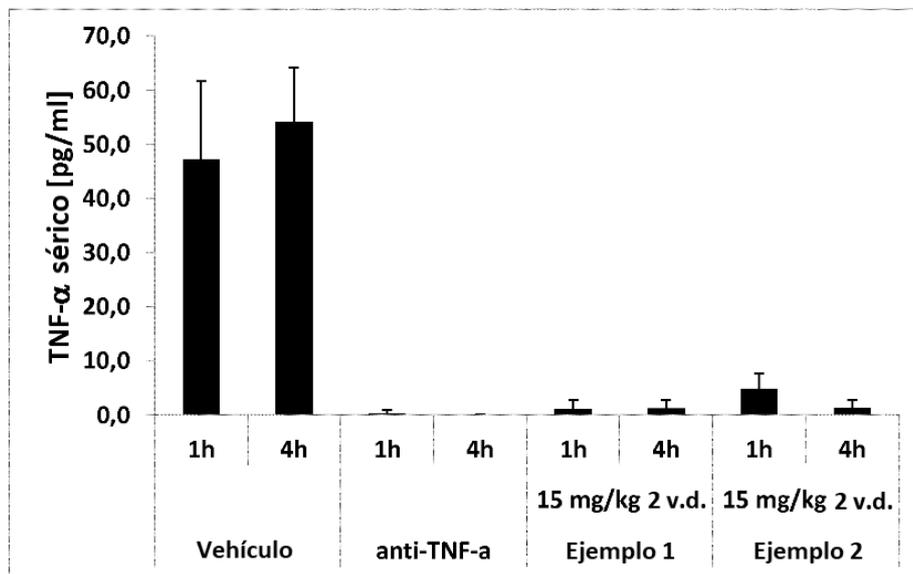


Figura 7c

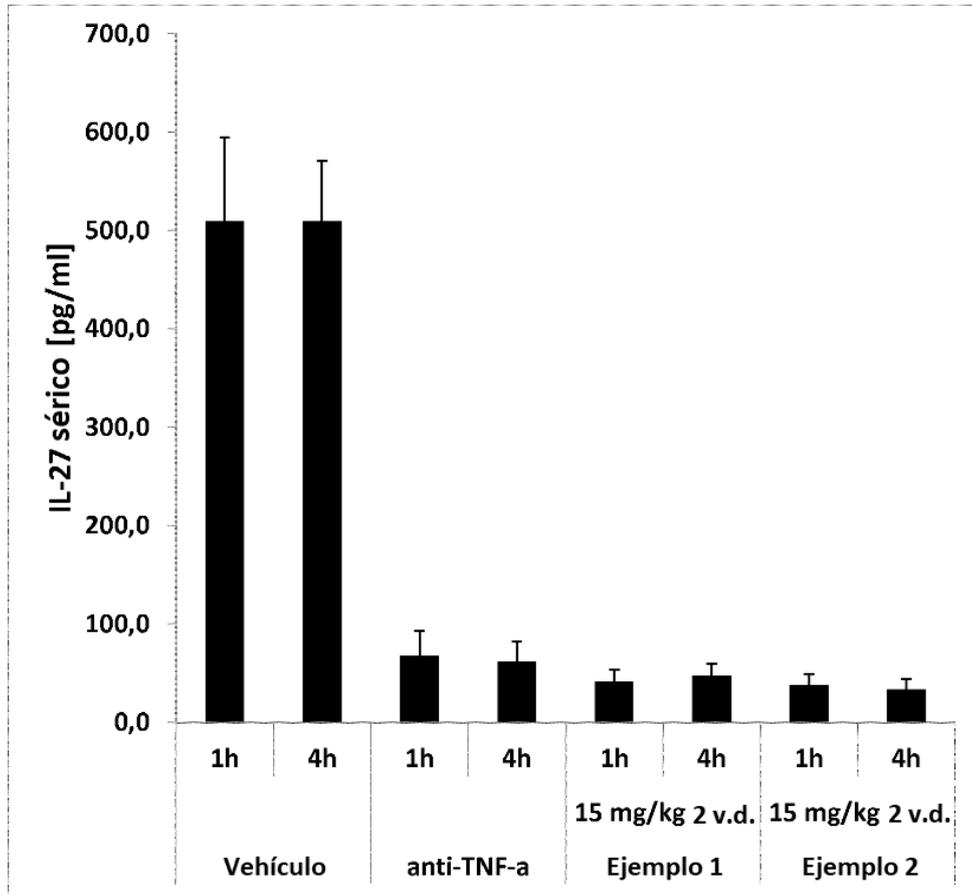


Figura 7d

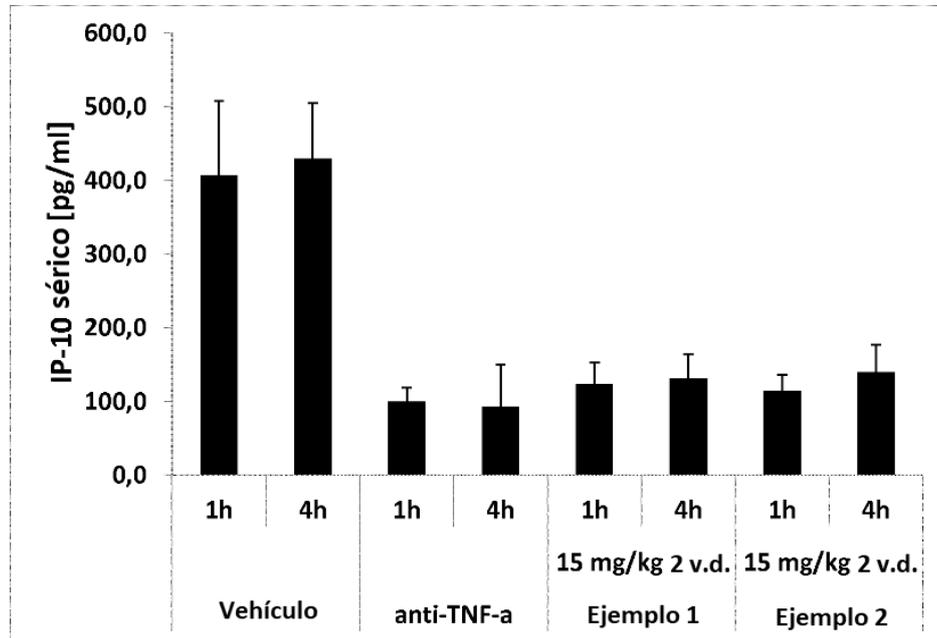


Figura 7e

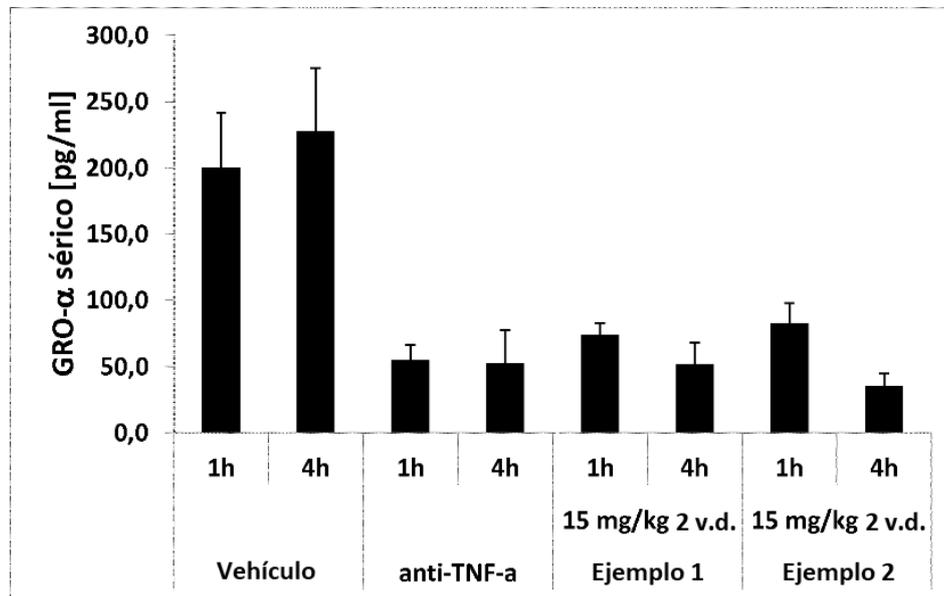


Figura 8

